



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CAGLIARI**

*Dipartimento di Scienze Biomediche*

**Dottorato di ricerca in Scienze Morfologiche  
Ciclo XXIV**

## **La percezione del gusto amaro nell'uomo:**

**La sensibilità gustativa al 6-n-propiltiouracile (PROP)  
come marker della variabilità individuale con  
implicazioni fisiologico-nutrizionali**

*Settore scientifico disciplinare di afferenza: BIO/09*

Tesi di Dottorato del:  
**Dott. Andrea Zonza**

Tutor:  
*Prof.ssa Iole Tomassini Barbarossa*

Coordinatore del Dottorato  
*Prof.ssa Valeria Sogos*

Esame finale anno accademico 2010-2011



Si ringrazia la “Fondazione Banco di Sardegna” per il contributo concesso al Dipartimento di Biologia Sperimentale per lo svolgimento del progetto dal titolo: “La percezione del gusto amaro nell’uomo: La sensibilità gustativa al 6-n-Propiltiouracile (PROP) come marker della variabilità individuale con implicazioni fisiologico-nutrizionali”, di cui è responsabile scientifico la Prof.ssa Iole Tomassini Barbarossa. Tale contributo è stato determinante per lo svolgimento della presente tesi di dottorato.

**Il lavoro presentato in questa tesi è argomento delle seguenti pubblicazioni scientifiche:**

- Padiglia A, Zonza A, Atzori E, Chillotti C, Calò C, Tepper BJ, Barbarossa IT. (2010) Sensitivity to 6-n-propylthiouracil is associated with gustin(carbonic anhydrase VI) gene polymorphism, salivary zinc, and body mass index in humans. *Am J Clin Nutr* 92:539–545
- Carla Calò, Alessandra Padiglia, Andrea Zonza, Laura Corrias, Paolo Contu, Beverly J Tepper and Iole Tomassini Barbarossa. (2010) Polymorphisms in TAS2R38 and the taste bud trophic factor, gustin gene co-operate in modulating PROP taste phenotype. *Physiol Behav.* 24:104(5):1065-71
- Iole Tomassini Barbarossa, Elena Atzori, Andrea Zonza and Alessandra Padiglia. (2011) A Rapid Screening Method for the Identification of a Single-Nucleotide Polymorphism in the Carbonic Anhydrase VI Gene in Studies of Sensitivity to the Bitter Taste of 6-n-Propylthiouracil. *Genetic testing and molecular biomarkers* Volume 15, Number 10, Pp. 721–724

## Abstract

La genetica abilita a sentire il sapore amaro delle tiouree, come il PROP, varia grandemente tra gli individui condizionando la scelta del cibo e la composizione corporea. Gli individui sensibili e non sensibili sono stati definiti rispettivamente “taster” e “nontasters”. Il termine “supertasters” viene usato per distinguere gli individui che percepiscono il PROP come estremamente amaro da quelli “medium tasters” che lo percepiscono come moderatamente amaro. La sensibilità al PROP è associata con gli aplotipi (PAV e AVI) del gene del recettore TAS2R38 e potrebbe essere associata a polimorfismi del gene della gustina (CA6). La gustina è un enzima zinco dipendente presente nella saliva umana implicata nello sviluppo delle papille gustative. Lo scopo di questo lavoro era quello di analizzare l’associazione tra la sensibilità al PROP, i polimorfismi del TAS2R38, il polimorfismo rs2274333 (A/G) del gene della gustina, lo Zinco salivare e il BMI.

In 76 volontari di età compresa tra i 21 e i 28 anni sono stati determinati il BMI e lo  $Zn^{2+}$  salivare. La sensibilità al PROP è stata determinata mediante valutazione dell’intensità della sensazione evocata da soluzioni soprasoglia e determinazione della soglia di percezione. L’analisi molecolare del TAS2R38 e del gene della gustina è stata effettuata mediante tecniche di PCR e sequenziamento dei frammenti ottenuti. I valori medi  $\pm$  ES della concentrazione dello Zinco salivare e del BMI sono risultati più alti negli individui “nontasters” rispetto a quelli determinati nei “supertasters”. La bassa sensibilità gustativa al PROP dei “nontasters” è risultata fortemente associata alla variante AVI del TAS2R38 e all’allele G del polimorfismo del gene della gustina, mentre l’alta sensibilità dei “supertasters” è risultata fortemente associata all’aplotipo PAV del TAS2R38 e all’allele A del gene della gustina. Inoltre, mentre l’allele A del gene della gustina è risultato essere più importante per la percezione delle basse concentrazioni di PROP, la variante PAV del TAS2R38 è risultato più importante per la valutazione dell’intensità della sensazione evocata da alte concentrazioni di PROP. Oltre a ciò, la combinazione dei genotipi dei due geni può giustificare il 60% della varianza fenotipica della valutazione della sensazione evocata da alte concentrazioni e il 40% di quella della soglia.

Questi dati mostrano che la sensibilità al PROP è inversamente correlata al BMI e allo Zinco salivare e direttamente associata al dimorfismo del gene della gustina che si ipotizza possa influenzare la funzione della proteina. Inoltre, questi nuovi risultati spiegano come la combinazione dei genotipi TAS2R38 e del gene della gustina possano modulare il fenotipo sensibilità al PROP fornendo uno strumento addizionale per la valutazione del comportamento alimentare umano e dello stato nutrizionale.

**Keywords:** Sensibilità al PROP, TAS2R38, gustina (CA6), BMI

**Indirizzo dell’Autore:** Dott. Andrea Zonza, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Cagliari, 09042 Monserrato-Cagliari, Italia.  
E-mail: [andreazonza@gmail.com](mailto:andreazonza@gmail.com)

## Indice

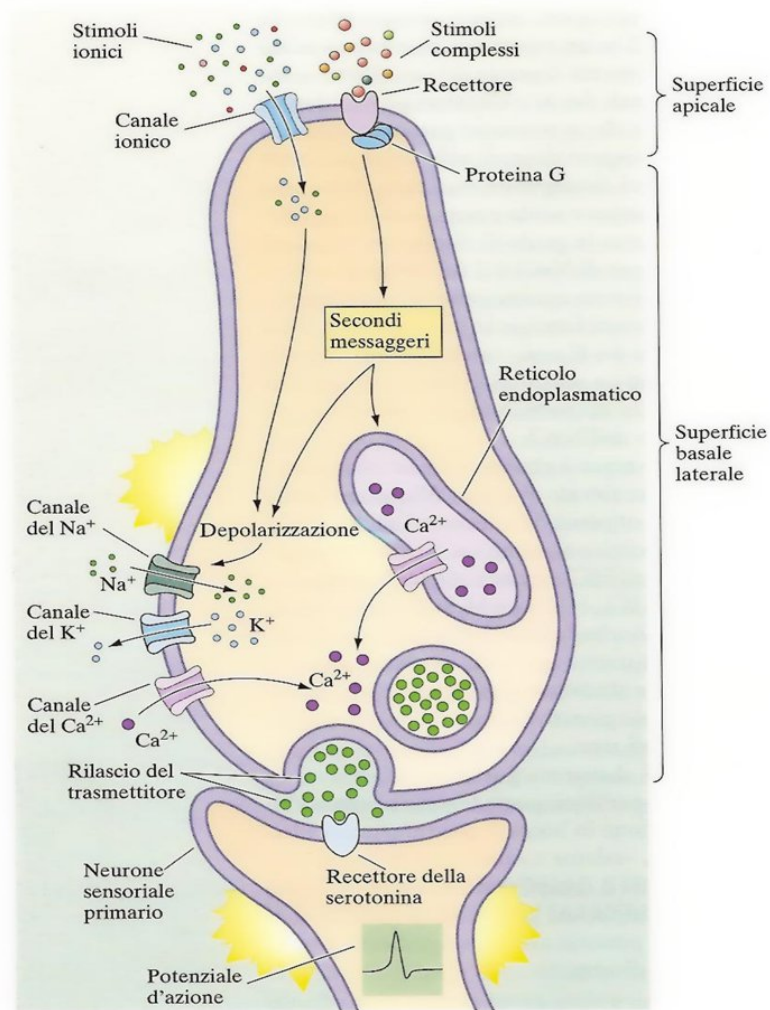
<b>Introduzione</b>	6
<b>Materiali e metodi</b>	26
Soggetti	26
Analisi delle caratteristiche psicologiche del comportamento alimentare	27
Determinazione della sensibilità al PROP	28
Determinazione della soglia di percezione gustativa	28
Determinazione dello Zinco salivare	29
Analisi molecolare	29
Identificazione e densità delle papille gustative fungiformi	33
Procedura sperimentale	34
Analisi dei dati	40
<b>Risultati</b>	43
Sensibilità gustativa al PROP	43
Analisi molecolare del polimorfismo rs2274333 (A/G) del gene della gustina	47
Analisi dell'effetto del polimorfismo rs2274333 (A/G) sulla funzione della gustina	49
Analisi molecolare dei tre polimorfismi di singoli nucleotidi (SNPs) del <i>TAS2R38</i>	55
Contributo del <i>TAS2R38</i> e del gene della gustina nella modulazione del fenotipo sensibilità al PROP	57
Indice di massa corporea (BMI) e “PROP taster status”	63
<b>Discussione e conclusioni</b>	64
<b>Bibliografia</b>	70

## INTRODUZIONE

La percezione gustativa fornisce informazioni sulle caratteristiche chimiche delle sostanze che vengono a contatto con le cellule gustative della mucosa orofaringea. Le cellule gustative infatti rappresentano i recettori sensoriali gustativi capaci di interagire con le molecole chimiche disciolte nella saliva e di trasdurre il contenuto informativo dello stimolo chimico in segnali nervosi. La maggior parte degli stimoli gustativi è costituita da molecole idrofile, non volatili, che includono sali, acidi, zuccheri, aminoacidi, e proteine. Il gusto di una sostanza è una caratteristica dipendente dalla sua composizione chimica. Si ritiene che le diverse centinaia di sapori percepibili derivino dalla combinazione di cinque qualità primarie: dolce, salato, amaro, acido e l'umami. La parola umami che deriva dal giapponese *umai*, delizioso, viene utilizzata per indicare il sapore del glutammato monosodico e attualmente costituisce una quinta qualità gustativa a se stante. Il gusto salato è attivato da sali ionizzati, come il cloruro di sodio e ha la funzione di mantenere l'equilibrio elettrolitico. Il gusto acido dipende dal pH della soluzione stimolante ha la funzione di monitorare il pH dell'organismo. Il gusto dolce e quello amaro sono evocati da classi eterogenee di sostanze, la maggior parte delle quali di natura organica e hanno la funzione di assicurare le riserve energetiche il primo, e quella di evitare sostanze tossiche potenzialmente dannose per l'individuo il secondo.

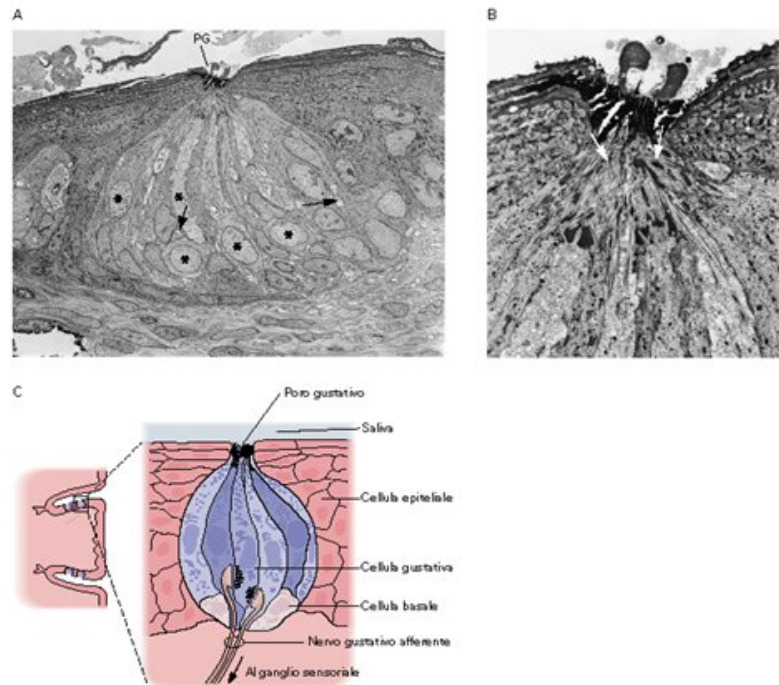
I gusti primari differiscono oltre che per la natura chimica dei composti in grado di evocarli, per i meccanismi di ricezione e di trasduzione dei segnali che si verificano a livello dei recettori gustativi. I recettori gustativi o cellule gustative (Fig. 1) sono cellule epiteliali specializzate, organizzate in strutture dette bottoni gustativi (Fig. 2). I bottoni gustativi contengono alcune decine di recettori sensoriali, oltre ad

elementi cellulari immaturi (cellule basali). La porzione apicale dotata di microvilli delle cellule gustative primarie entra in contatto con la saliva che bagna la superficie epiteliale mediante un canalicolo (poro gustativo). Tramite la porzione basale, i recettori gustativi stabiliscono contatti sinaptici di tipo chimico con le terminazioni di fibre afferenti primarie. Ogni fibra innerva numerosi bottoni anche in zone dell'epitelio linguale molto distanti tra loro e, nello stesso bottone, diversi recettori. Allo stesso tempo, ogni recettore gustativo è innervato da più fibre afferenti. Le cellule basali costituiscono una popolazione di cellule staminali che garantisce il ricambio dei recettori gustativi (il ciclo vitale delle cellule gustative mature è di circa dieci giorni, nei mammiferi). I bottoni gustativi sono largamente diffusi nell'epitelio della lingua, particolarmente nella sua porzione dorsale, ma sono presenti anche nella mucosa del palato, della faringe, dell'epiglottide e del terzo superiore dell'esofago. Nella lingua, sono per lo più localizzati nelle papille, strutture specializzate di cui si distinguono diversi tipi: nell'uomo, solo le papille circumvallate, fogliate e fungiformi hanno bottoni gustativi (Fig. 3). Le papille circumvallate e fogliate contengono migliaia di bottoni gustativi. Le papille circumvallate sono concentrate nella parte posteriore del dorso della lingua, a livello della 'V' linguale. Le papille fogliate sono maggiormente presenti sui lati della lingua. Le papille fungiformi si trovano numerose sulla punta della lingua e contengono i bottoni gustativi.

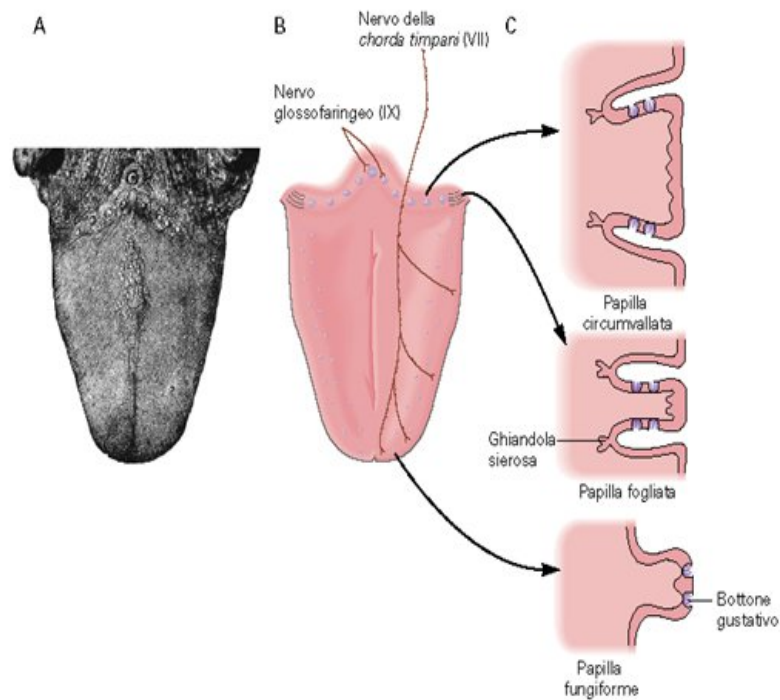


**Figura 1.** Schema di recettore gustativo. La superficie apicale contiene sia canali sia recettori accoppiati a proteine G che sono attivati da stimoli chimici. La superficie basolaterale contiene canali al Na, K e Ca voltage dipendenti, come pure un apparato per la trasmissione sinaptica mediata dalla serotonina.





**Figura 2.** Fotografia al microscopio ottico di un bottone gustativo (A) (B). Schema di un bottone gustativo con i vari tipi di cellule e i nervi gustativi. La superficie apicale dei recettori gustativi è provvista di microvilli orientati verso il poro gustativo (C).



**Figura 3.** Rappresentazione schematica dei tre tipi delle papille gustative e loro localizzazione sulla superficie dorsale della lingua.

I microvilli dei recettori gustativi sono la sede della trasduzione degli stimoli. Nel poro gustativo, le sostanze disciolte nella saliva entrano in contatto con la porzione apicale della membrana delle cellule gustative. I meccanismi di ricezione e di trasduzione avvengono con modalità diverse a seconda della natura chimica della sostanza [1-8].

La ricezione degli stimoli chimici avviene grazie all'interazione di questi con proteine transmembrana a sette domini ad alfa elica che sono accoppiati a una

proteina G eterotrimerica denominata gustoducina. Queste proteine appartengono a due principali classi o famiglie: la famiglia TAS1R (T1R) e la famiglia TAS2R (T2R) [9]. I recettori che interagiscono con molecole organiche che evocano la sensazione dolce e di umami appartengono a tre sottotipi T1R1 T1R2 T1R3 della famiglia di recettori T1R. I recettori T1R eterodimerizzano per formare il recettore funzionante: il dimero T1R1/ T1R3 costituisce il recettore per l'umami, mentre il dimero T1R2/ T1R3 per le sostanze dolci. In alcuni casi le sostanze dolci si legano a omodimeri T1R2 e/o T1R3 che però mostrano una minore sensibilità. Mentre circa 30 sono i recettori che interagiscono con le molecole che evocano l'amaro e appartengono alla famiglia dei T2R. Questi recettori non dimerizzano.

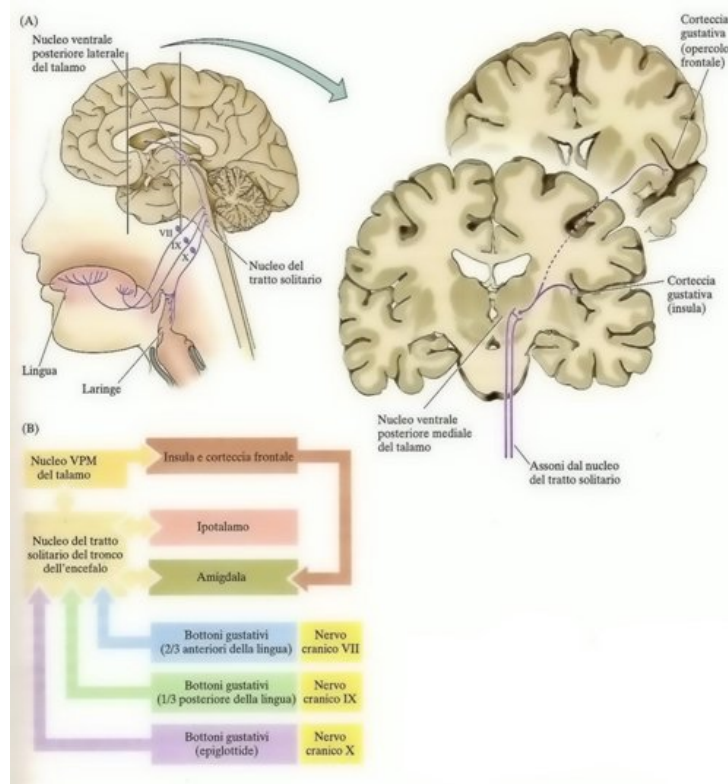
I meccanismi di trasduzione come già detto sono diversi a seconda del tipo di sostanza chimica. Ad esempio la stimolazione gustativa prodotta dall'NaCl è caratterizzata dal passaggio dello stesso ione attraverso canali ionici amiloride sensibili. Il canale amiloride sensibile è permeabile anche agli ioni H<sup>+</sup>, quindi la trasduzione delle sostanze che vengono percepite come aspre è dovuta ad un ingresso di questi ioni attraverso canali Na<sup>+</sup> sensibili all'amiloride. Acido e salato, in relazione alle loro concentrazioni nella saliva, interferiscono in parte tra loro a livello periferico [10]. Analogamente anche la trasduzione dei sali di K<sup>+</sup> potrebbe comportare l'ingresso di questi ioni attraverso i canali K<sup>+</sup> apicali. Le differenze che si osservano nella capacità di percepire il gusto dei diversi sali di Na<sup>+</sup> potrebbero anche dipendere dalla diversa permeabilità dei rispettivi anioni attraverso le giunzioni strette e dalla conseguente diversa capacità di interessare i canali ionici localizzati a livello delle membrane basali laterali delle cellule gustative. La trasduzione dei segnali evocati dai composti dal sapore dolce comporta l'attivazione di recettori accoppiati a proteine G (GPCR) presenti sulla superficie apicale delle

cellule gustative [11]. Negli zuccheri, l'attivazione di questi recettori (GPCR) depolarizza le cellule gustative per attivazione dell'adenilato ciclasi, che a sua volta aumenta la concentrazione di cAMP che causa la chiusura diretta o indiretta dei canali del potassio presenti sulla membrana basale laterale. I dolcificanti sintetici come la saccarina attivano recettori accoppiati a proteine G (GPCR) differenti, che a loro volta attivano la fosfolipasi C con formazione di inositolo trifosfato (IP3) e diacilglicerolo (DAG). Un aumento di IP3 fa aumentare la concentrazione intracellulare di  $Ca^{++}$ , determinando il rilascio del trasmettitore. Un aumento del DAG attiva la proteina chinasi "A" (PKA), che a sua volta fosforila e causa la chiusura dei canali  $K^+$  della membrana basale laterale, amplificando in questo modo l'effetto. Entrambe queste vie di percezione delle sostanze dolci possono coesistere nella stessa cellula gustativa. I composti dal sapore amaro comprendono molte classi chimiche distinte. Alcune di queste sono alcaloidi come il chinino che bloccando i canali al  $K^+$  determina la depolarizzazione della membrana. Altri come la caffeina, gli L-amminoacidi, l'urea e anche sali come l' $MgSO_4$  non utilizzano gli stessi recettori o le stesse vie di trasduzione del segnale. I composti organici dal sapore amaro si legano tipicamente a recettori accoppiati a proteine G (GPCR) che attivano la gustducina (una proteina G presente nelle cellule gustative), che a sua volta attiva la fosfodiesterasi, riducendo la concentrazione di nucleotidi ciclici e causando la chiusura dei canali attivati dai nucleotidi ciclici presenti sulle membrane basali laterali delle cellule gustative. Il gusto umami, verrebbe trasdotto da un particolare tipo di recettore metabotropico del glutammato che viene anche espresso in alcune regioni cerebrali. Le grosse molecole lipidiche sono scisse dalla lipasi linguale in molecole di minor peso molecolare [12], capaci di stimolare i recettori gustativi. Inoltre, le membrane apicali dei bottoni gustativi contengono trasportatori degli acidi

grassi, molecole che permettono l'entrata degli acidi grassi nelle cellule [13]. Gilbertson et al. [14] hanno rilevato che la presenza degli acidi grassi chiude il canale del potassio, normalmente aperto, depolarizzando la membrana. La maggior parte dei meccanismi di trasduzione determina la depolarizzazione della membrana della cellula gustativa (potenziale del recettore), che a sua volta determina aumento della concentrazione di  $Ca^{++}$  per apertura di canali voltaggio-dipendenti o per mobilitazione da riserve intracellulari. L'aumento del  $Ca^{++}$  provoca l'esocitosi del mediatore chimico e la conseguente trasmissione del segnale alle fibre afferenti gustative primarie (Fig.1).

Le fibre afferenti che convogliano le informazioni gustative alle strutture centrali appartengono a tre paia di nervi cranici (VII, IX, X) e possono avere funzioni diverse a seconda della loro provenienza dalle diverse parti della lingua (Fig. 4). Ogni fibra può rispondere, in genere, a 2, 3 o tutte e 4 le qualità gustative, anche se con intensità che sono differenti. La porzione anteriore della lingua è innervata da un ramo del nervo facciale (corda del timpano VII). Infatti i bottoni gustativi delle papille fungiformi e delle papille fogliate, sono innervate da tale ramo [15-18]. Gli assoni della corda del timpano si proiettano alla porzione anteriore della lingua insieme al nervo linguale (una diramazione della divisione mandibolare del V nervo), il quale porta l'innervazione somato-sensoriale dalla stessa area. La corda del timpano porta inoltre le fibre efferenti pregangliari parasimpatiche al ganglio submandibolare, per l'innervazione delle ghiandole salivari sublinguali e submandibolari [19]. Un altro ramo sensoriale del facciale, il gran petroso superficiale (GSP), attraverso il nervo palatino minore, innerva i bottoni gustativi presenti sul palato molle e attraverso il nervo nasopalatino, quelle dei dotti nasoincisorali [20-22]. Inoltre il gran petroso

superficiale contiene le fibre pregangliari parasimpatiche che giungendo nel ganglio pterigopalatino, sinaptano con le cellule postgangliari, che a loro volta innervano le ghiandole mucose del palato duro e molle [19]. Le fibre sensitive del facciale originano dalle cellule a T del ganglio genicolato situato nel canale petroso del Falloppio. La sensibilità gustativa, attraverso i rami centrali e il nervo intermediario, viene veicolata al nucleo del tratto solitario del ponte (NST) che, rispondendo in maniera particolare a sostanze nutritive, assume il significato funzionale di nucleo gustativo [23-25].



**Figura 4.** Organizzazione del sistema gustativo umano. (A) Il disegno a sinistra mostra il rapporto tra i recettori della cavità orale e della parte superiore del canale alimentare, e il nucleo del tratto solitario del bulbo. La sezione frontale sulla destra mostra il nucleo ventrale posteriore mediale del talamo e le sue connessioni con le regioni gustative della corteccia cerebrale. (B) Schema delle vie fondamentali deputate all'elaborazione delle informazioni gustative.

La sensibilità gustativa per un determinato stimolo varia grandemente tra gli individui e condiziona la scelta del cibo e quindi lo stato nutrizionale dell'individuo. Il sapore di un cibo o di una bevanda è infatti, fondamentale nel determinarne la commestibilità e l'appetibilità; il rifiuto di un cibo a causa del suo sapore sgradevole è importante per la sopravvivenza di molte specie animali. Di norma, le sostanze dolci, fonte di energia per l'organismo, provocano una sensazione piacevole e l'innesco di riflessi di salivazione, di deglutizione e di preparazione del tubo digerente alla digestione e all'assorbimento. Il sapore amaro provoca sovente il rifiuto del cibo o della bevanda e, se molto intenso, stimola il riflesso del vomito: questo è presumibilmente in relazione al fatto che la maggior parte delle sostanze tossiche presenti in natura ha sapore amaro. La sensibilità gustativa è normalmente alta per il gusto amaro, in accordo con quanto detto sulla funzione di monitoraggio della presenza di sostanze potenzialmente tossiche rispetto a quelle invece che possono essere utili per l'organismo. Il grado di piacevolezza di un sapore è tuttavia soggettivo e può essere influenzato dall'esperienza e dalle necessità nutrizionali. Sia l'animale che l'uomo tendono a rifiutare un cibo dal quale in passato siano stati intossicati. Lo stesso cibo può essere avvertito come molto gradevole e desiderabile all'inizio del pasto e sgradevole quando viene raggiunta la sazietà. In base alle informazioni gustative e olfattive si ha la capacità di operare una scelta tra diversi cibi e preferire quello che fornisce l'apporto nutritivo più consono alle esigenze dell'organismo [26]. È interessante ricordare che il sapore può essere in relazione alla concentrazione. Ad esempio, il sale da cucina a bassa concentrazione viene percepito come dolce, ad alta concentrazione come amarognolo. La sensibilità gustativa può variare grandemente anche in funzione dell'età e del sesso dell'individuo [27,28]. È noto che le donne mostrano una maggiore sensibilità

rispetto agli uomini per gli stimoli dolci e salati, e una sensibilità minore per gli stimoli acidi [29-31] . E' noto che anche l'invecchiamento può determinare modificazioni della sensibilità gustativa che possono essere dovute anche a fattori diversi dalle sole modificazioni dell'invecchiamento delle strutture coinvolte. Non è stato infatti dimostrato che il numero dei calici gustativi e delle papille diminuisca con l'invecchiamento. In realtà, molti dei farmaci che sono assunti dai soggetti anziani alterano la percezione gustativa e influiscono negativamente sull'output salivare (peggiorando ulteriormente il senso del gusto). Anche la perdita delle capacità olfattive, legata all'età o a patologie, può giocare un ruolo importante nel diminuire la sensibilità gustativa [32-34].

Il ruolo fisiologico della variabilità individuale della sensibilità gustativa potrebbe essere ricondotto quindi a meccanismi di adattamento evolutivo a specifiche condizioni ambientali per riconoscere sostanze potenzialmente dannose o necessarie per le funzioni corporee [35,36]. In particolare per quanto riguarda il gusto amaro, per esempio è noto che le piante producano una grande varietà di composti dal sapore amaro come meccanismo di protezione contro i predatori [37], e l'abilità dell'uomo a riconoscere basse concentrazioni di questi composti amari e spesso altamente tossici, tra i quali amminoacidi, peptidi, polifenoli, isoflavonoidi e glucosinati, alcaloidi come il chinino, isotiocianati, acidi grassi ecc., [38-40], rappresenta un importante meccanismo di adattamento evolutivo che ne limita il consumo determinando nell'individuo risposte di rifiuto e reiezione [35]. Diversamente la possibilità di riconoscere alcune classi di composti amari che invece possono agire come antibatterici e/o antiossidanti, come per esempio quelli presenti nel tè, nel caffè, in alcuni frutti, negli agrumi e nel cioccolato [37], può essere di grande beneficio per la salute dell'uomo [41].



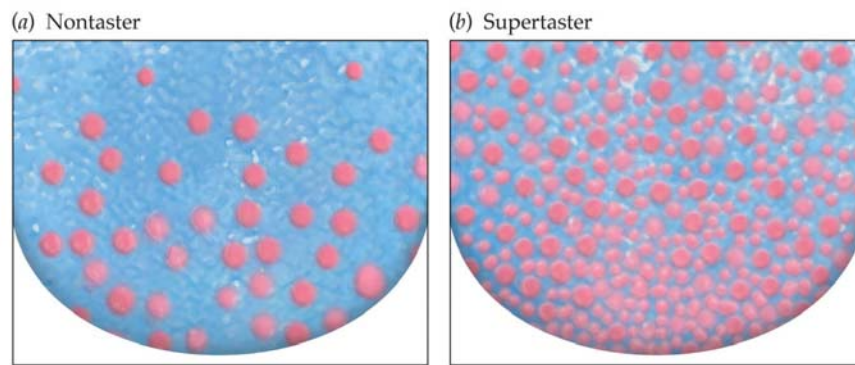
Il gusto amaro è mediato da recettori accoppiati a proteine G appartenenti alla sottofamiglia di TAS2R [42,43] della membrana delle cellule gustative. Questi recettori presentano 7 domini trans membrana ad alfa elica e un residuo amminoacidico conservato. L'uomo possiede ~25 TAS2R recettori per l'amaro codificati da cluster di geni localizzati sui cromosomi 5p, 7q, 12p [44] e finora, sono stati identificati circa 550 molecole in grado di legarsi a questi recettori [45]. Tuttavia, questo numero rappresenta solo una piccola frazione delle migliaia di composti dal sapore amaro di origine vegetale che esistono in natura. Poiché il numero di composti supera notevolmente il numero di recettori, sembra probabile che i singoli recettori rispondono a più di un tipo di composto chimico dal sapore amaro [46]. E' noto infatti che esistono recettori che rispondono a un numero limitato di composti, altri che invece rispondono a una vasta gamma di sostanze chimiche [47]. Il TAS2R8 è un esempio di recettore altamente selettivo per il quale sono noti solo 3 ligandi con strette analogie strutturali. I recettori TAS2R10, -14 e -46 sono invece recettori altamente promiscui. Infatti, quando espressi su cellule, sono stati in grado di rispondere al 50 % dei composti amari provati. Il recettore TAS2R38 che si lega al gruppo chimico  $N-C=S$  delle tiouree, come la feniltiocarbammide (PTC) e il 6-n-propiltiouracile (PROP) [48], viene considerato un recettore modestamente restrittivo ed è stato dimostrato in grado di rispondere anche a stimoli privi del gruppo  $N-C=S$  [47].

Le differenze individuali nella percezione gustativa dell'amaro sono ereditate geneticamente [37] e riflettono la ricca diversità allelica dei recettori TAS2Rs. Variazioni nella sequenza nel gene *TAS2R19* è stata associata con le differenze nell'abilità a percepire il sapore amaro del chinino [49]. Mutazioni nei geni *TAS2R31* e *TAS2R43* (in misura minore) possono essere responsabili per le risposte individuali

al retrogusto amaro della saccarina e acesulfame-k (acesulfame potassico) [50,51]. Inoltre, variazioni nella sequenza dei geni *TAS2R16*, *TAS2R19* e l'aplo-blocco composto di *TAS2R3*, -4, -5 sono responsabili delle differenze individuali della percezione rispettivamente dell'alcool, del succo di pompelmo e del caffè [52]. La genetica variabilità nella sensibilità a sentire il sapore amaro delle tiouree come il PROP e la PTC, rappresenta il più studiato fenotipo del gusto amaro nell'uomo [35,53]. Le tiouree sono composti che contengono il gruppo chimico N-C=S che è il responsabile del loro sapore amaro [54-56]. Il gruppo chimico tiocianato è anche presente nei glucosinati e nelle goitrine [35], sostanze comunemente trovate nelle crocifere ed in altre piante appartenenti alla famiglia delle *Brassicaceae* [55]. Le goitrine hanno una potente proprietà antitiroidea e possono essere tossiche quando consumate in grandi quantità in popolazioni ad alto rischio per deficienza tiroidea [56]. Una intrigante spiegazione per l'esistenza di questa caratteristica genetica nell'uomo, è che possa essere servita come meccanismo di adattamento evolutivo conseguente alle abitudini alimentari locali [57]. Un maggior rifiuto nei confronti delle *Brassicaceae* sarebbe stato un meccanismo di vantaggio per la selezione di quegli individui con più elevata sensibilità per l'amaro. La diversa sensibilità gustativa nei confronti delle tiouree è nota da tempo e risale a quando accidentalmente Fox [58] la scoprì mentre sintetizzava nel suo laboratorio dei dolcificanti. Alcune polveri di PTC si dispersero nell'aria provocando delle lamentele tra i suoi colleghi a causa del sapore amaro che sentivano sulle loro labbra mentre Fox invece non avvertiva nessun sapore. Prove successive rivelarono che il PTC era insapore per circa il 30% degli individui e moderatamente o intensamente amara per la maggior parte [59]. Gli individui possono essere definiti come tasters o nontasters sulla base della loro sensibilità al PROP e alla PTC. La frequenza dei non

tasters varia largamente tra la popolazione, oscillando da un minimo del 7% ad un massimo del 40% [53]. Nella popolazione Caucasica la frequenza dei nontasters è di circa il 30% [57,58,60,61]. Una spiegazione intrigante di questa differente frequenza della sensibilità gustativa alle tiouree nelle diverse popolazioni, è stata suggerita per le popolazioni africane dove, l'alta frequenza delle persone con bassa sensibilità alle tiouree, risulterebbe dalla selezione per la resistenza alla malaria [26]. E' stato infatti ipotizzato che la bassa sensibilità, osservata in aree con malaria endemica, è la conseguenza del fatto che certi composti amari delle piante sono fattori di protezione contro la malaria. Per cui, nelle aree con malaria endemica, il beneficio che si ottiene dal consumo di piante amare, che normalmente vengono escluse come potenzialmente dannose, potrebbe superare il rischio di avvelenamento.

Successivamente gli individui "PROP taster" sono stati ulteriormente divisi in "supertaster" e "medium tester" sulla base della valutazione dell'intensità della sensazione evocata da soluzioni soprasoglia di PROP rispetto a quella evocata da soluzioni soprasoglia di NaCl [35,62-66]. Bartoshuk fu il primo ad utilizzare il termine supertasters per distinguere gli individui che percepiscono il PROP come estremamente amaro da quelli che lo percepiscono come moderatamente amaro [62,63]. Sebbene numerosi studi supportano la classificazione degli individui nei tre gruppi fenotipici (nontasters, medium tasters and supertasters) [60,64,66-72,86], altri lavori suggeriscono che la sensibilità al PROP possa essere un più continuo fenotipo [69-72,74,86]. Tuttavia, numerosi lavori hanno messo in evidenza come i supertasters presentino una maggiore densità di papille fungiformi sulla superficie anteriore della lingua, quando comparati con gli altri gruppi [63,75-77] (Fig.5).

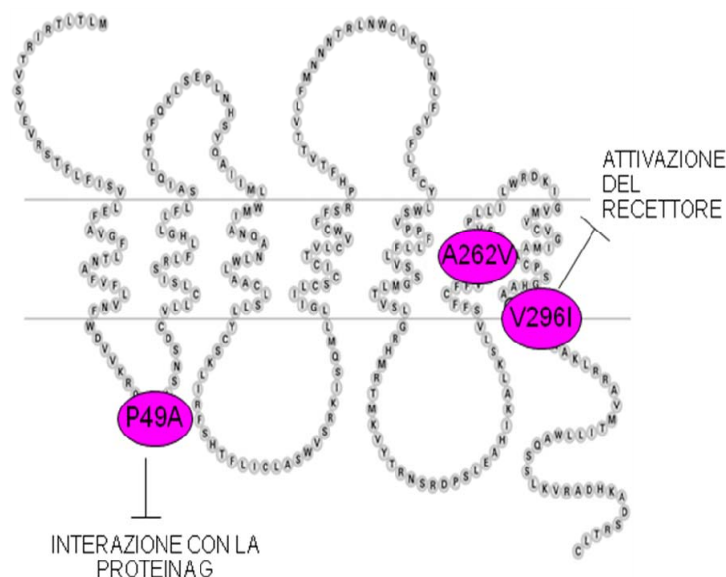


**Fig. 5.** Schema che riporta le differenze nella densità di papille fungiformi sulla porzione anteriore della lingua dei “nontasters” rispetto a quella dei “supertasters” .

Queste differenze anatomiche potrebbero parzialmente spiegare la più grande sensibilità gustativa dei supertasters nei confronti di una vasta gamma di stimoli gustativi [78], inclusi altri tipi di composti dal sapore amaro, sostanze dolci, sostanze irritanti (etanolo o chili), grassi e composti cremosi ecc.. [63,67,75,79-90].

L’abilità a sentire il sapore amaro delle tiouree è associata agli aplotipi del gene *TAS2R38* che derivano da tre singoli polimorfismi che risultano in tre sostituzioni aminoacidiche (Pro49Ala, Ala262Val, and Val296Ile) [48] (Fig.6). Si conoscono due comuni aplotipi, la variante dominante PAV associata alla elevata sensibilità e la variante recessiva AVI associata a una bassa o nulla sensibilità alle tiouree. Altri aplotipi rari (AAV, AAI, e PVI) che presentano una sensibilità intermedia sono stati descritti limitatamente a specifiche popolazioni o in determinate aree geografiche (AAI popolazione sub-Sahariana) [57]. Gli individui omozigoti o eterozigoti per la variante PAV sono in grado di sentire il sapore amaro delle tiouree anche a basse

concentrazioni, mentre gli individui che sono completamente incapaci di sentire le tiouree e quelli che le sentono solo ad alte concentrazioni sono omozigoti per la variante AVI [61,71,76]. Alcuni studi hanno dimostrato che la presenza di due varianti PAV, rispetto alla condizione di eterozigosi non conferisce vantaggi addizionali nella percezione dell'intensità dell'amarevolezza di soluzioni soprasoglia di PROP [71]. Quindi, i genotipi del *TAS2R38* non sono in grado di spiegare completamente le differenze oro-sensoriali tra individui “medium tasters” e “supertasters”. I genotipi del *TAS2R38* sono in grado di predire la maggior parte (55-85%), ma non la totalità delle variazioni nel fenotipo del PROP, implicando che altri fattori epigenetici possano essere coinvolti nell'espressione di questo carattere genetico [35,48,61].



**Fig. 6.** Schema del recettore dell'amaro TAS2R38 con evidenziati i polimorfismi associati ai diversi livelli di sensibilità.

La sensibilità gustativa al PROP viene spesso usata come indice generale della percezione chemosensoriale dato che è stato dimostrato essere associata alla percezione di una vasta gamma di stimoli gustativi, come molti altri stimoli dal sapore amaro, sostanze dolci, sostanze irritanti e anche con la percezione delle sostanze grasse [35]. Dato il valore nutrizionale che i lipidi hanno nella dieta la relazione tra sensibilità al PROP e accettabilità per cibi contenenti grassi risulta essere di notevole interesse. Diversi studi hanno riportato che i PROP “nontasters” rispetto ai “tasters” presentano una più bassa abilità nel riconoscere e percepire i grassi contenuti i cibi, mostrando una più alta accettabilità nei confronti di questi ultimi [91-97]. Questa interpretazione è supportata da altri risultati che affermano, per l'appunto, una minore accettabilità degli individui PROP-sensibili nei confronti di cibi ad alto contenuto di grassi, come la crema sbattuta [92], il gelato [97], le ciambelle, la maionese, il bacon e la salsiccia [69]. Esistono evidenze a favore del fatto che i “PROP nontaster” hanno un più alto indice di massa corporea (BMI) rispetto ai “taster” [60,64,67,98-100], ma esistono anche dati che contraddicono questa affermazione [101-104].

Nel comportamento alimentare i fattori cognitivi possono giocare un ruolo di fondamentale importanza, così come possono influire sullo stato del peso corporeo e della salute dell'uomo. Il controllo cognitivo dell'assunzione di cibo [105] è associato ad un minor apporto energetico, una minor assunzione di grassi [106,107] e un più frequente utilizzo di prodotti a basso contenuto lipidico [108,109]. Queste osservazioni suggeriscono che nella scelta del cibo le persone che ne controllano volontariamente l'assunzione sono condizionate più fortemente dal loro peso corporeo che dallo stimolo gustativo [100]. Quindi, l'associazione tra sensibilità al PROP e BMI potrebbe essere mascherata nelle persone che bloccano

volontariamente l'assunzione di cibo in modo da controllare il proprio peso corporeo, mentre sarebbe evidente un'associazione negativa solo nelle persone che mangiano liberamente [99]. Altri dati non riportano queste caratteristiche [66,75]. Quindi il fatto che un autocontrollo elevato modifichi la relazione tra la sensibilità al PROP e il peso corporeo rimane una questione ancora aperta. Una seconda caratteristica del comportamento alimentare è la disinibizione, sia da un punto di vista comportamentale sia dal punto di vista delle variazioni di peso [105]. La disinibizione è correlata con l'alimentazione eccessiva e con un maggior grado di adiposità [109,110]. L'associazione tra la disinibizione e la sensibilità al PROP non è mai stata studiata. È possibile però che i "non taster" che, mostrano un più alto grado di accettazione per i grassi, possano essere più vulnerabili verso le emozioni che portano ad una alimentazione eccessiva e conseguentemente possa in questi individui determinarsi un aumento di peso e di obesità. Tutti questi risultati portano all'ipotesi di una correlazione inversa tra il PROP status e l'indice di massa corporea (BMI) [60,98-100]. Altri lavori mostrano che non ci sia nessuna correlazione tra il PROP taster status e questa variabile [76,101-104]. La mancanza di consenso tra i dati che analizzano la relazione sensibilità al PROP e BMI suggerisce che altri fattori contribuiscano a determinare oltre che la sensibilità al PROP anche il comportamento alimentare, la percezione e le preferenze alimentari nelle persone diversamente sensibili al PROP. Inoltre dato che il PROP fenotipo può avere diverse implicazioni per lo stato nutrizionale, potrebbe essere di notevole interesse caratterizzare altri fattori che possono contribuire alle differenze nella predisposizione genetica che le persone hanno per sentire il sapore amaro delle tiouree.

Le differenze individuali della sensibilità al PROP potrebbero essere correlate con variazioni nella composizione chimico-fisica della saliva. Fox [58] per primo

suggerì che la composizione salivare potrebbe essere uno dei fattori responsabili delle differenze individuali gustative, e ipotizzò che queste differenze possano dipendere dalla presenza o assenza nella saliva di alcuni costituenti organici come colloidali e/o proteine. Tra le proteine salivari di particolare interesse è la gustina, una anidrasi carbonica di tipo VI (CA6). La gustina è una zinco metallo-proteina secreta dalle cellule acinose delle ghiandole salivari parotidi, sottomandibolari, ghiandole von Ebner nell'uomo [111-115]. Diminuzioni della secrezione salivare di gustina sono state associate con ridotta o distorta funzione gustativa e olfattoria [116]. Alcuni autori hanno suggerito che la gustina possa agire come fattore trofico promuovendo lo sviluppo e l'accrescimento delle gemme gustative agendo sulle cellule staminali gustative [117]. La funzione enzimatica della gustina dipende dalla presenza dello Zinco nel suo sito attivo [118,119]. Inoltre è noto che il trattamento con lo Zinco può migliorare la funzione gustativa negli anziani [120], aumentare la concentrazione di gustina in pazienti con ipogeusia [121], e normalizzare la funzione gustativa e la morfologia delle papille gustative in pazienti deficienti di CA6 [117]. Recentemente è stato dimostrato che un polimorfismo del gene della gustina (CA6) è coinvolto nella modulazione della sua attività enzimatica, cioè nella sua funzione tamponatrice delle variazioni di pH del cavo orale [122]. E' ben noto che i polimorfismi genetici costituiscano un meccanismo mediante il quale le persone esibiscono variazioni funzionali all'interno di un determinato range fisiologico [122]. Sono stati dimostrati altri polimorfismi nel gene della gustina, oltre a quello coinvolto nella sua funzione tamponatrice, ma non sono state studiate loro associazioni con funzioni fisiologiche e tanto meno con la funzione gustativa.

Sulla base di tutte queste considerazioni in questo lavoro ci si è proposti di esaminare possibili associazioni tra la sensibilità gustativa al PROP, la



concentrazione salivare di zinco e il polimorfismo rs2274333 (A/G) del gene che codifica per la gustina. E' stato scelto di investigare questo polimorfismo perché si pensa che possa essere coinvolto nella modulazione della funzione gustativa essendo localizzato nell'esone 3 del gene della gustina che codifica per i residui aminoacidici del sito attivo di legame con lo zinco. Noi ipotizziamo che la condizione "nontaster" possa essere associata a una forma meno funzionale della gustina che può portare a diminuzioni della funzione gustativa. Questa dimostrazione potrebbe fornire la prima spiegazione meccanicistica del perché i PROP nontasters sono insensibili, rispetto ai PROP tasters, a una vasta gamma di stimoli orali anche diversi dalle tiouree, e del fatto che i PROP supertaster hanno una maggiore densità di papille gustative rispetto ai nontaster.

Inoltre, in questo lavoro ci si è proposti di studiare come i polimorfismi gene del recettore TAS2R38 e del gene della gustina, possono co-operare nella modulazione del fenotipo sensibilità al PROP. Il fenotipo della sensibilità al PROP è stato determinato in ogni individuo mediante misure per la determinazione della soglia che permettono di individuare l'abilità del soggetto a discriminare basse concentrazioni dello stimolo, questa metodologia permette di discriminare gli individui tasters dai nontasters [35,64,71,123] e mediante valutazioni dell'intensità della sensazione evocata da alte concentrazioni che permettono di distinguere anche gli individui supertasters dai medium tasters [35,64-66]. I due metodi quindi misurano differenti caratteristiche della funzione gustativa che potrebbero essere importanti per la comprensione delle relazioni geni-funzione gustativa [72]. In ultimo ci si è proposti di verificare se nella popolazione da noi utilizzata, omogenea geneticamente e nella quale è stato analizzato il comportamento cognitivo alimentare, la sensibilità gustativa potesse avere influenze sull'indice di massa corporea.

## **MATERIALI E METODI**

### **Soggetti**

La ricerca dei volontari è stata fatta tra gli studenti frequentanti la Cittadella Universitaria di Monserrato che si sono resi disponibili a completare il proprio lavoro coscientemente. 76 ragazzi tutti di origine sarda (29 uomini e 47 donne), di età compresa tra i 20 e 29 anni, hanno aderito all'iniziativa. Durante questa fase è stato necessario spiegare ai candidati l'obiettivo del lavoro, il tempo richiesto e la procedura sperimentale. I volontari sono stati scelti in funzione di alcune informazioni raccolte tramite questionari o interviste, questo per assicurarsi che nessuno avesse evidenti disfunzioni gustative od olfattorie. A tal proposito sono state determinati per ogni soggetto, i valori di soglia per le 4 qualità gustative principali (dolce, acido, salato e amaro). Inoltre, è stato necessario accertarsi che nessuno soffrisse di raffreddore o di qualsiasi indisposizione che potesse interferire con le capacità percettive, che non assumesse farmaci, che non fosse affetto da allergie alimentari, che non fosse sottoposto ad alcuna dieta particolare, che avesse un peso stabile (non avesse avuto variazioni del proprio peso corporeo di più di 5 Kg negli ultimi tre mesi) e con un indice di massa corporea (BMI) normopeso. I valori di BMI degli individui selezionati erano compresi tra 18,6 e 21,3 Kg/m<sup>2</sup>. Ci si assicurava inoltre che tutti i soggetti selezionati avessero il tempo necessario per portare a termine tutte le prove.

Ad ogni soggetto è stato presentato, fatto leggere e firmare un consenso informato prima dell'inizio di ogni esperimento. Questo lavoro è stato approvato dal Comitato Etico dell'Azienda Ospedaliera dell'Università degli Studi di Cagliari (Prot. N. 451/09 del 15/10/2009 ed emendamento verbale N.8 del 29/11/2010), ed è

stato quindi eseguito in conformità ai principi etici fissati nella dichiarazione di Helsinki del 1964.

### **Analisi delle caratteristiche psicologiche del comportamento alimentare**

Il test psicometrico utilizzato per l'analisi delle caratteristiche del comportamento alimentare, ed in particolare per la misura del controllo cognitivo dell'assunzione di cibo, del grado disinibizione nei confronti del cibo e della voracità, è stato il questionario a tre fattori di Stunkard and Messick [105]. Tramite questo questionario, costituito da 51 domande di facile comprensione, è possibile quantificare il grado del controllo volontario dell'assunzione di cibo ovvero la tendenza, che alcune persone possiedono, a bloccare l'assunzione di cibo in modo da controllare il proprio peso corporeo in maniera cosciente mediante il fattore 1, la disinibizione sia da un punto di vista comportamentale sia dal punto di vista delle variazioni di peso mediante il fattore 2, ed infine la non resistenza alla fame cioè il grado di voracità che un individuo possiede nei confronti del cibo mediante il fattore 3. I soggetti nei quali viene misurato un punteggio relativo al fattore 1 del questionario  $> 10$  vengono classificati come fortemente controllati nell'assunzione di cibo, quelli con punteggio relativo al fattore 2 del questionario  $> 8$  vengono classificati come molto disinibiti nei confronti dell'assunzione di cibo e quelli con punteggio relativo al fattore 3 del questionario  $> 8$  vengono classificati come affetti da una gran fame [107,108].

## **Determinazione della sensibilità al PROP**

### ***Valutazioni dell'intensità della sensazione evocata da alte concentrazioni (PROP bitterness)***

L'abilità dei soggetti di sentire il PROP è stata stimata attraverso valutazione dell'intensità della sensazione evocata da soluzioni soprasoglia di PROP rispetto a quella evocata da soluzioni soprasoglia di NaCl [35,63-66], usando il "3-solution-test" (65,124). Il test consiste nell'utilizzo di tre soluzioni di PROP (0.032, 0.32 e 3.2 mmol/l) (Sigma-Aldrich, Milan, Italy) e di NaCl (0.01, 0.1 e 1.0 mol/l) (Sigma-Aldrich, Milan, Italy) disciolte in acqua minerale pura (pH 6.84). L'NaCl è stato usato come confronto standard in quanto la sensibilità al NaCl non varia con il "PROP status" [65].

Le soluzioni venivano preparate il giorno prima dell'esperimento e conservate in frigo fino ad 1 h prima di iniziare l'esperimento e venivano presentate a temperatura ambiente in campioni da 10 ml.

## **Determinazione della soglia di percezione gustativa**

Per soglia di percezione gustativa di una sostanza o soglia protopatica si intende la concentrazione minima in soluzione in grado di determinare una sensazione gustativa. Quest'ultima si differenzia dalla soglia di riconoscimento o epicritica, più elevata, per la quale si intende la concentrazione minima di uno stimolo in grado di essere riconosciuta precisamente. La soglia di percezione per il PROP è stata determinata in ciascun volontario usando una variante del test triangolare a scelta forzata (3-AFC) [31,126,127] e mediante il test "Up and Down" in accordo con Bartoshuk [127]. In entrambe i casi sono state testate soluzioni di PROP nel range di

concentrazione compreso tra 0,00001 a 3,2 mM di PROP disciolte in acqua minerale pura in campioni da 10 ml.

### **Determinazione dello Zinco salivare**

Per minimizzare ogni possibile contaminazione dello  $Zn^{2+}$  tutta la vetreria è stata lavata per 24h con una soluzione 4mol/L di HCl e successivamente lavata con acqua deionizzata. Tutti i campioni di saliva sono stati analizzati al microscopio ottico, questo per evitare contaminazioni da resti di cibo e da sangue, i campioni contaminati sono stati scartati. In seguito, i campioni sono stati centrifugati ad una velocità di 1.700 X g per 10 min (Centrifuga Eppendorf, modello 5417C; Eppendorf, Hamburg, Germany), questo per eliminare i detriti cellulari. Il supernatante ottenuto dai campioni centrifugati, veniva poi prelevato con pipette Pasteur, trasferito in un tubo sterile, diluito in rapporto di 1:5 con acqua deionizzata libera da  $Zn^{2+}$  e immediatamente analizzato. La concentrazione dello  $Zn^{2+}$  salivare è stata determinata utilizzando il Kit QuantiChrom zinc assay (Gentaur, Brussels, Belgium), nel quale l'intensità del colore era direttamente proporzionale alla concentrazione dello  $Zn^{2+}$  nel campione. L'assorbanza di ogni campione è stata misurata a 245nm e la concentrazione totale dello  $Zn^{2+}$  è stata espressa in microgrammi per decilitro.

### **Analisi molecolare**

Tutti i soggetti sono stati genotipizzati per i polimorfismi dei tre singoli nucleotidi (SNPs) alle paia di basi 145 (C/G), 785 (C/T), e 886 (G/A) del locus *TAS2R38*, e per il polimorfismo rs2274333 (A/G) del gene della gustina (CA6).

Gli SNPs di *TAS2R38* danno luogo le tre sostituzioni aminoacidiche: prolina/alanina al residuo 49, alanina /valina al residuo 262, valina/isoleucina al

residuo 296. Queste sostituzioni caratterizzano i due maggiori aplotipi (PAV e AVI) più i tre aplotipi rari (AAI, PVI e AAV).

Il polimorfismo rs2274333 (A/G) del gene della gustina, consiste nella sostituzione dell'aminoacido Ser90Gly in posizione 90.

Il DNA è stato estratto da campioni di saliva usando il kit Invitrogen Charge Switch Forensic DNA Purification (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). La concentrazione del DNA purificato è stata stimata mediante misurazione della densità ottica alla lunghezza d'onda di 260nm. Le tecniche di PCR sono state impiegate per amplificare le regioni del gene *TAS2R38* d'interesse, che includevano i tre polimorfismi, e per amplificare la regione del gene della gustina che includeva il polimorfismo rs2274333. I primers utilizzati sono stati sintetizzati da Invitrogen (Europrim, Invitrogen Cambridge, UK). Per determinare gli aplotipi del *TAS2R38*, l'amplificazione con PCR, seguita dall'analisi di restrizione usando HaeIII è stata effettuata per la rivelazione dello SNP in posizione 145, e dal sequenziamento diretto per l'identificazione degli SNPs alla posizione 785 e 886. Il seguente set di primer è stato utilizzato per amplificare il frammento di 221 bp che include il primo dei tre SNPs:

5'-CCTTCGTTTCTTGGTGAATTTTGGG ATG  
TAGTGAAGAGGCCGG-3' (sense Primer) 5'-AGGTTGGCTTG  
GTTTGCAATCATC-3' (antisense Primer). Il primer di attacco si lega al gene *TAS2R38* a livello dei nucleotidi 101-144. Qui troviamo un piccolo mismatch alla posizione 143, dove il primer presenta una G (evidenziata in grassetto), mentre il gene presenta una A. Questo mismatch è fondamentale per gli esperimenti di PCR, perché il nucleotide A nella sequenza del gene *TAS2R38*, è rimpiazzato da una G in ognuno dei prodotti di amplificazione. Questo crea la prima G della sequenza di riconoscimento GGCC di HaeIII, permettendo il taglio dell'allele taster amplificato.

L'allele nontaster amplificato legge invece GGC e di conseguenza non subisce nessun taglio. La miscela di reazione della PCR (25  $\mu$ L) conteneva 250 ng di DNA, 10 pmol di ciascun primer, 1.5 mM di  $MgCl_2$ , 100 mM di Tris-HCl a pH 8.3, 50 mM di KCl, 200  $\mu$ M di dNTP mix, e 1.5 unità di Hot Master Taq Eppendorf (DNA polimerasi). I cicli termici di amplificazione sono state effettuati in una Personal Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Germany). Il protocollo di amplificazione consisteva in una iniziale denaturazione a 95°C per 5 min, seguiti da 35 cicli di denaturazione a 95° per 30 s, "annealing" a 64°C per 45 s, e allungamento a 72°C per 45 s. Per l'analisi del polimorfismo G/C alla posizione 143, un'aliquota da 3  $\mu$ L di prodotti della PCR sono stati miscelati con 17  $\mu$ L di soluzione contenente 2  $\mu$ L 10 x NE Buffer (50 mM di NaCl, 10 mM di Tris-HCl, 10 mM di  $MgCl_2$ , 1mM di dithiothreitol, pH 7.9), 0.2  $\mu$  di HaeIII (10 000 U) (Sigma- Aldrich, St Louis, MO), e 14.8  $\mu$ L di H<sub>2</sub>O deionizzata e sterile. La soluzione veniva incubata a 37°C per 4 h. Il prodotto digerito è stato miscelato con 5mL di loading buffer ed elettroforizzato su gel verticale di poliacrilamide al 10%. Le bande di DNA sono state evidenziate da una colorazione argento [128]. La PCR 100bp Low Ladder DNA è stata usata come Mr markers (Sigma-Aldrich). I polimorfismi alle posizioni 785 e 886 sono stati identificati da una singola reazione di PCR utilizzando il sense primer 5'-TCGTGACCCCAGCCTGGAGG-3' e il primer antisense 5'-GCACAGTGTCCGGAATCTGCC-3' delimitanti un frammento di 298 bp. La miscela di reazione PCR (25  $\mu$ L) conteneva 250 ng di DNA, 10 pmol di ciascun primer, 1.5 mM di  $MgCl_2$ , 100 mM di Tris-HCl a pH 8.3, 50 mM di KCl, 200  $\mu$ M di dNTP mix, e 1.5 unità di Hot Master Taq Eppendorf. I cicli termici di amplificazione sono stati effettuati in una Personal Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Germany). Il protocollo di amplificazione consisteva in una iniziale denaturazione a 95°C per 5

min, seguiti da 35 cicli di denaturazione a 95° per 30 s, annealing a 60°C per 30 s, e infine allungamento a 72°C per 30 s. I campioni amplificati sono stati analizzati su gel di agarosio 1% e su gel di poliacrilamide 6% e colorati con bromuro di etidio. La PCR 100 bp Low Ladder DNA è stata usata come Mr markers.

Per il polimorfismo del gene della gustina rs2274333, è stato amplificato un frammento di 253 bp con il primer 5'TGACCCCTCTGTGTTCACCT3' e con il primer complementare 5'GTGACTATGGGGTTCAAAGG3'. La miscela di reazione (25 µL) conteneva 250 ng di DNA, 10 pmol di ciascun primer, 1.5 mM di MgCl<sub>2</sub>, 100 mM di Tris-HCl a pH 8.3, 50 mM di KCl, 200 µM di dNTP mix, e 1.5 unità di Hot Master Taq Eppendorf. I cicli termici di amplificazione sono stati effettuati in una Personal Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Germany). Il protocollo di amplificazione consisteva in una iniziale denaturazione a 95°C per 5 min, seguiti da 35 cicli di denaturazione a 95 °C per 30 s, annealing a 54°C per 30 s, e infine allungamento a 72 °C per 30 s. Un allungamento finale è stato effettuato a 72 °C per 5 min. I campioni amplificati sono stati analizzati su gel di agarosio 1% e su gel di poliacrilamide 6% e colorati con bromuro di etidio. Il pUC 18 HaeIII digest phago DNA è stato utilizzato come Mr markers (Sigma-Aldrich). I prodotti di PCR sono stati sequenziati grazie all'utilizzo del sequenziatore automatico ABI Prism. L'analisi delle sequenze nucleotidiche e aminoacidiche dedotte sono state eseguite con OMIGA version 2.0 software (Oxford Molecular, Madison, WI)



### **Identificazione e densità delle papille gustative fungiformi**

Il metodo impiegato per la determinazione della densità delle papille fungiformi gustative era simile a quello descritto da Shahbake et al. [129]. Con questo metodo era possibile registrare 3-10 immagini dell'area circolare (6 mm di diametro) della parte anteriore sinistra della punta della lingua vicino alla linea mediana (Fig.7 A e B) che era stata precedentemente colorata mediante il colorante alimentare blu (blue food dye E133). Per la registrazione delle immagini veniva utilizzata una fotocamera Canon Eos D400 (10 megapixels) che montava un obiettivo EFS 55-250 mm. Le immagini venivano poi riversate in un computer (Sony Vaio PCG 8Y3M) utilizzando una porta USB e venivano analizzate usando l'opzione "zoom" nel programma Adobe Photoshop 7.0. L'ingrandimento utilizzato nella fotocamera era di  $\times 26.04$ , in base alla lunghezza focale del teleobiettivo che andava da un minimo di 55mm ad un massimo di 250mm. Quando la presenza delle papille era difficile da confermare, tale ingrandimento veniva ulteriormente incrementato di un coefficiente di 1.6 utilizzando l'opzione "zoom" nel programma Adobe Photoshop. Le papille gustative fungiformi per lo più a forma di fungo sono state identificate in base a criteri precedenti descritti [129-131], e sono prontamente distinguibili dalle papille filiformi per la diversa colorazione. Infatti le papille fungiformi appaiono chiare per la colorazione molto leggera con il colorante alimentare, diversamente dalle papille filiformi che appaiono molto più scure dopo la stessa colorazione. Nella Fig. 7 B, indicati da frecce, sono ben visibili i pori gustativi delle papille fungiformi attraverso i quali le sostanze gustative disciolte nella saliva possono passare per raggiungere le membrane apicali delle cellule gustative. Per effettuare il conteggio delle papille fungiformi veniva utilizzata la migliore immagine di ciascun individuo.

Il conteggio veniva sempre effettuato senza conoscere l'identità del soggetto dal quale era stata registrata l'immagine.

### **Procedura sperimentale**

Tutti i soggetti sono stati testati in quattro differenti giorni a distanza di un mese. Nelle donne è stata fatta particolare attenzione, in modo da effettuare la valutazione al 6° giorno del ciclo mestruale, questo per evitare cambiamenti nella sensibilità gustativa dovuti alla fase estrogenica [132]. Ciascun volontario doveva presentarsi nel laboratorio almeno 15 min prima dell'inizio dell'esperimento per abituarsi alle condizioni ambientali del laboratorio che venivano mantenute costanti per tutta la sessione sperimentale (temperatura: 21 - 23° C, umidità relativa al valore ritenuto confortevole dai giudici (40 %) e l'illuminazione, con luce standard solare bianca 15.000 lux). Durante questo periodo di tempo, i volontari venivano informati verbalmente della procedura. A tutti i soggetti è stato richiesto di astenersi dal mangiare, bere e dall'utilizzare prodotti per l'igiene orale nelle 8 h antecedenti l'esperimento. Ciascun individuo veniva pesato e misurato in altezza per la definizione del suo indice di massa corporea (BMI: Kg/m<sup>2</sup>), veniva fatto sedere su una poltrona con braccioli e veniva invitato a stare tranquillo e rilassato, quindi sottoposto al questionario di Stunkard and Messick [105] che durava circa 30 min. Nella prima sessione sperimentale veniva prelevato da ciascun volontario un campione di 5 ml di saliva non stimolata attraverso aspiratore in plastica che veniva raccolto all'interno di tubi di polipropilene sterili. Per raccogliere i campioni di saliva senza alcuna stimolazione specifica, ai volontari veniva richiesto di non ingerire la saliva prodotta per 5 min. I campioni venivano conservati a -80°C finché si potesse

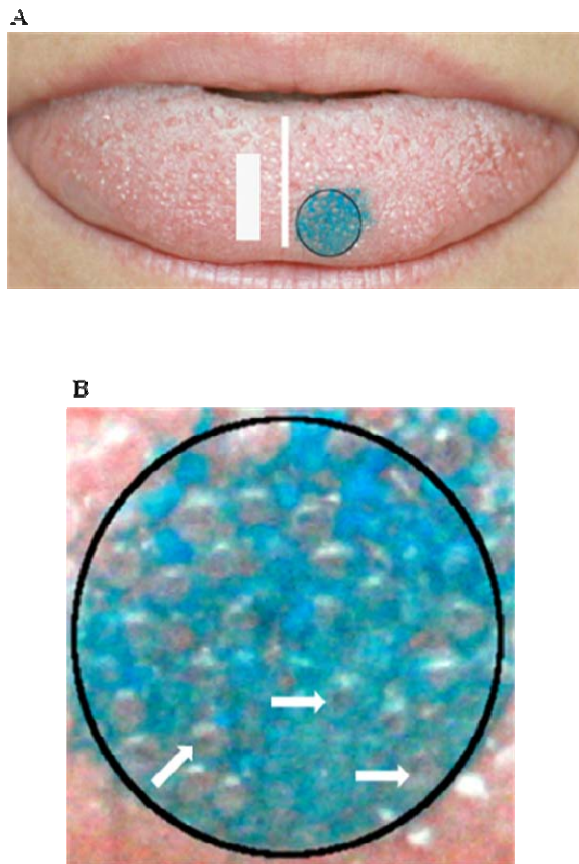
procedere con l'analisi molecolare. Dopo un ora si procedeva alla determinazione del "PROP status" del soggetto, cioè alla sua classificazione all'interno dei tre gruppi "nontasters", "medium tasters" e "supertasters". Per la determinazione del PROP "taster status", ciascun volontario veniva testato 2 volte a distanza di un mese (prima e seconda sessione sperimentale). L'ordine di presentazione degli stimoli nelle due sessioni era invertita, cioè i soggetti ai quali veniva presentato il PROP come primo stimolo nella prima sessione, nella seconda sessione veniva presentato come secondo stimolo. Le soluzioni di ciascuno stimolo venivano testate a random. L'intensità della sensazione evocata da ciascuna stimolazione veniva stimata mediante la Scala LMS (labeled magnitude scale) (Fig.8) [126]. Tale scala è una scala quasi-logaritmica, nella quale dei descrittori semantici corrispondono a determinate ampiezze della valutazione della sensazione evocata [126,133]. La scala è ancorata verso il basso al descrittore "appena percettibile" e in alto al descrittore "il più forte immaginabile". Quest'ultimo deve essere riferito alla sensazione orale più forte che il soggetto abbia mai avuto come esperienza nella sua vita (un cibo piccante, un dentifricio forte, una caramella ...) [65]. La posizione delle etichette verbali corrisponde, nella scala, ad una percentuale della lunghezza totale: appena percettibile 1.4, debole 6.1, moderato 17.2, forte 35.4, molto forte 53.3, il più forte immaginabile 100 [126]. Dopo aver effettuato la stimolazione, al volontario veniva presentata la scala LMS tramite l'utilizzo di un computer e gli veniva chiesto di posizionare, usando il mouse, un marker in corrispondenza del valore della scala che, secondo lui, rappresentava meglio l'intensità della sensazione gustativa percepita. Ogni stimolazione era poi seguita da un accurato risciacquo con acqua minerale. Tra una stimolazione e l'altra si lasciava passare un periodo minimo di 60 s. La media delle due sessioni veniva poi calcolata per ogni soggetto e risultati venivano caricati nel "database". Questa

procedura permette di costruire le funzioni dell'intensità gustativa soprasoglia per il PROP e per l'NaCl [65,100,134].

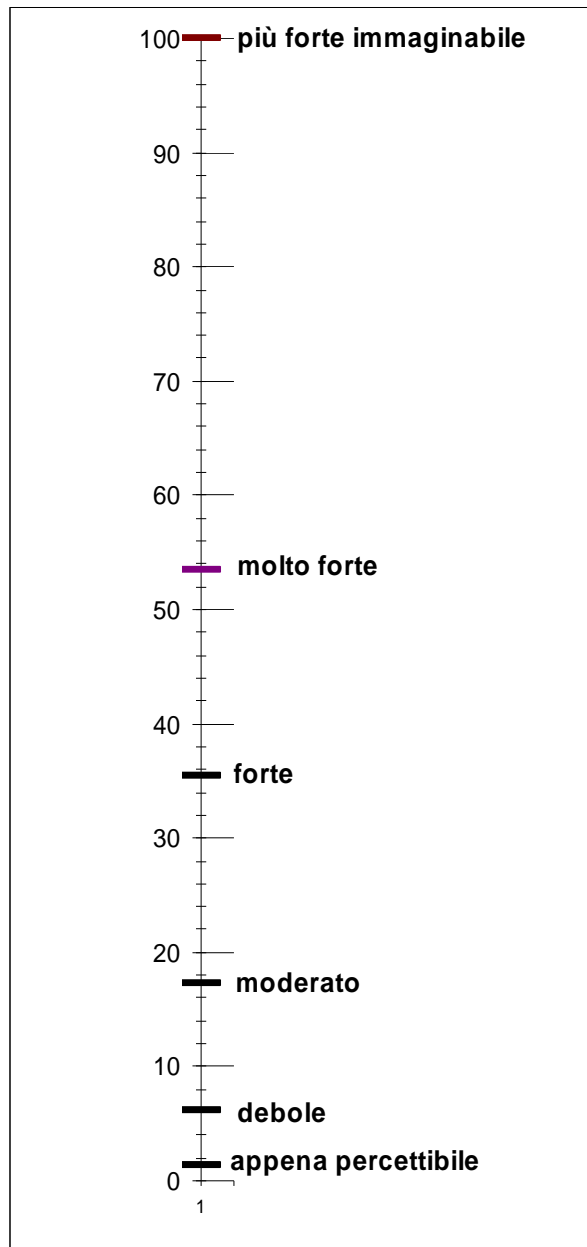
La soglia per il PROP è stata determinata in ciascun individuo con le due metodologie durante la terza visita. Prima dell'inizio della sessione sperimentale, tutti i campioni dovevano risciacquarsi accuratamente la bocca con dell'acqua minerale. Dapprima si procedeva alla determinazione mediante il test triangolare, secondo l'opzione della "scelta forzata". Ogni concentrazione è stata testata 4 volte da tutti i giudici. Per ogni concentrazione vengono presentate alla persona tre bicchierini uguali codificati, due dei quali rappresentano il bianco (contengono solo acqua, il solvente), mentre uno solo contiene il campione da testare. Dopo aver assaggiato tutte e tre le soluzioni il giudice deve esprimere il suo giudizio, contrassegnando su una scheda il numero del bicchierino che, a suo parere, contiene il campione di gusto differente dagli altri due. Secondo l'opzione della scelta forzata il giudice deve dare un giudizio anche quando non percepisce nessuna differenza tra le tre soluzioni. La soglia veniva definita come l'intensità dello stimolo che ha una probabilità pari a 0.5 di essere rilevato nelle condizioni del test. Dopo una pausa di riposo che veniva concessa a ciascun soggetto si procedeva alla determinazione della soglia con il test "Up and Down". A ciascun soggetto venivano presentati 3 bicchierini monouso posizionati a random, uno di questi conteneva la soluzione di PROP 0.032 mM, mentre gli altri due solo esclusivamente acqua. Ai volontari veniva chiesto di tenere in bocca, a contatto con l'intera area orale, la soluzione per 5 sec. Dopo avere testato tutte e tre le soluzioni, i soggetti dovevano scegliere quale soluzione era diversa dalle altre due. Se il soggetto individuava la presenza dello stimolo per due volte consecutive, nella prova seguente si testava la concentrazione immediatamente più bassa [127]. Al contrario, quando il soggetto non individuava lo

stimolo, allora si testava la concentrazione immediatamente più alta. La soglia viene definita dalla media geometrica di 6 reversal. L'intervallo tra le varie concentrazioni così come l'intervallo tra i 3 stimoli, era di 60 s.

Nella quarta visita, si acquisivano le immagini digitali delle lingue di ciascun soggetto per la determinazione della densità delle papille gustative fungiformi. Ciascun soggetto veniva invitato a risciacquare la bocca con acqua deionizzata (conducibilità:  $0.9 \mu\text{S}$ ) e quindi veniva fatto sedere su una sedia davanti a un bancone. Per ridurre al minimo i movimenti della testa, i soggetti dovevano sostenerla poggiando le braccia sul bancone e tenendo la loro testa con le mani in modo che il mento potesse protrudere in avanti. Quindi i soggetti dovevano tirare fuori la lingua che veniva tenuta ferma dalle labbra (Fig.7A). Dopo aver asciugato la lingua con un pezzo di carta da filtro, una strisciolina (10 mm x 3 mm) di carta da filtro che doveva servire come unità di misura per calcolare l'ingrandimento dell'immagine, veniva posizionata nella parte anteriore del lato destro della lingua (Fig.7A). Quindi un cerchietto di carta da filtro di 6 mm di diametro bagnato con il colorante blu, veniva posizionato per 3 secondi sulla parte anteriore sinistra della punta della lingua vicino alla linea mediana (Fig.7A). La lingua veniva nuovamente asciugata dopo la rimozione del cerchietto di carta filtro prima di poter scattare le immagini con la fotocamera come precedentemente descritto.



**Fig 7.** Immagine rappresentante la lingua di un soggetto e ingrandimento di un particolare. **(A)** Lingua con, evidenziata da una linea bianca, la linea mediana che separa la parte sinistra dove è localizzata l'area circolare di 6mm di diametro colorata nella quale è stata effettuata la conta delle papille fungiformi e la parte destra dove è stata posizionata una strisciolina di 10 mm x 3mm di carta da filtro utilizzata come unità di misura. **(B)** Ingrandimento dell'area circolare colorata. Nell'ingrandimento sono ben evidenti le papille fungiformi con la comune struttura a fungo che appaiono chiare per la colorazione con il colorante alimentare, diversamente dalle papille filiformi che appaiono molto più scure dopo la medesima colorazione. Le frecce indicano i pori gustativi presenti all'apice delle papille fungiformi.



**Figura 8.** Scala LMS (labeled magnitude scale)

## **Analisi dei dati**

Per la classificazione di ogni soggetto all'interno dei tre gruppi "nontasters", "medium tasters" e "supertasters" venivano comparate per ogni soggetto le curve dose-risposta per i due stimoli [65]. Se la funzione soprasoglia dell'NaCl cresceva più rapidamente della funzione del PROP, i soggetti venivano classificati come "nontasters". Se, invece era la funzione soprasoglia del PROP a crescere più rapidamente della funzione dell'NaCl, allora i soggetti venivano classificati come "supertasters". Infine, quando si assisteva ad una sovrapposizione della funzione del PROP con la funzione dell'NaCl, allora i soggetti venivano classificati come "medium tasters". Il confronto della valutazione dell'intensità della sensazione evocata dalle tre concentrazioni di PROP e le tre concentrazioni di NaCl nei "nontasters", "medium tasters" e "supertasters" è stato effettuato con ANOVA a tre vie (Statistica, Statsoft).

ANOVA ad una via è stata utilizzata per comparare i valori medi  $\pm$  SE di soglia e i punteggi dell'intensità della sensazione evocata dalla soluzione soprasoglia di PROP (3,2 mM) determinati nei "nontasters", "medium tasters" e "supertasters". La relazione tra l'intensità della sensazione evocata dalla soluzione soprasoglia di PROP (3,2 mM) e i valori di soglia, è stata valutata utilizzando l'analisi della correlazione lineare.

Il metodo di Fisher (Genopop software version 4.0; <http://Kimura.univ-montp2.fr/~rousset/Genopop.htm>) [135] è stato utilizzato per analizzare le distribuzioni dei genotipi e le frequenze aploipiche e alleliche in accordo con il PROP status.



Gli effetti del PROP “taster status” sullo zinco salivare sono stati analizzati mediante ANOVA ad un via. Il test post-hoc di Tukey è stato utilizzato per tutti i confronti a due a due.

L’effetto del polimorfismo rs2274333 (A/G) dell’esone 3 sulla struttura secondaria della gustina CA6 è stato analizzato usando il software PSIPRED, secondary structure prediction (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) [136]. L’effetto del polimorfismo sulla propensione a creare regioni di disordine nella sequenza della proteina è stata analizzata con il software GlobPlot (<http://globplot.embl.de>) [137].

Le differenze genetiche tra i tre gruppi di “taster” basata sulla combinazione dei genotipi del gene della gustina e del gene *TAS2R38* sono state esaminate mediante il metodo di Markov Chain (Arlequin software version 3.1; <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>) [138]. Tutti valori di  $P < 0.05$  erano considerati significativi.

L’analisi quantitativa del contributo di *TAS2R38* e del gene della gustina alla definizione “PROP bitterness” e alla soglia è stata eseguita mediante l’utilizzo della procedura “Generalized Linear Model” (GLM). Questa procedura fornisce un’analisi di regressione e della varianza per una variabile dipendente da una o più variabili indipendenti. La GLM è stata effettuata attraverso una procedura graduale a ritroso, iniziando con il modello completo includendo le variabili indipendenti e le interazioni di secondo ordine tra loro, e cancellando passo dopo passo le interazioni e variabili non significative. Gli effetti differenti tra la condizione di omozigosi e di eterozigosi, sono stati analizzati per entrambi i geni. L’effetto dell’interazione tra i due loci è stato anche incluso nel modello. I valori di “Partial Eta Squared” rappresenta la forza di associazione di ogni variabile indipendente (genotipi del

*TAS2R38* e del gene della gustina), con le variabili dipendenti (“PROP bitterness” e soglia), dopo che gli effetti di tutte le altre variabili indipendenti sono stati considerati. La procedura “GLM” è stata utilizzata per valutare i valori medi attesi della “PROP bitterness” e della soglia per ogni combinazione dei genotipi del *TAS2R38* e del gene della gustina. Il grado di sovrapposizione tra i valori medi attesi e quelli osservati definisce in quale misura i due loci possono spiegare la “PROP bitterness” e la soglia. Il valore del “Global R Squared” fornisce una misura di questa associazione. Gli individui con aplotipi rari sono stati esclusi dall’analisi GLM”.

Le differenze tra il BMI determinato negli individui dei tre “taster groups” sono state confrontate con l’analisi della covarianza (ANCOVA), nella quale i tre fattori del questionario di Stunkard & Messick sono stati considerati come covariabili. Il confronto post-hoc è stato fatto con il test di Tukey.

Il valore della densità di papille fungiformi determinato in ciascun individuo nell’area circolare colorata di 6 mm di diametro è stato convertito in numero di papille fungiformi /cm<sup>2</sup>. Le differenze tra la densità determinata negli individui con genotipo AA, AG e GG per il polimorfismo rs2274333 (A/G) del gene della gustina sono state confrontate con analisi della varianza (ANOVA) a 1-via. Il test post-hoc di Tukey è stato utilizzato per il confronto a due a due.

L’analisi statistica è stata effettuata utilizzando i softwares STATISTICA per WINDOWS (versione 7.0; StatSoft Inc, Tulsa, OK, USA) e SPSS (SPSS Inc. Headquarters, Chicago, IL, USA). Tutti valori di  $P < 0.05$  erano considerati significativi.

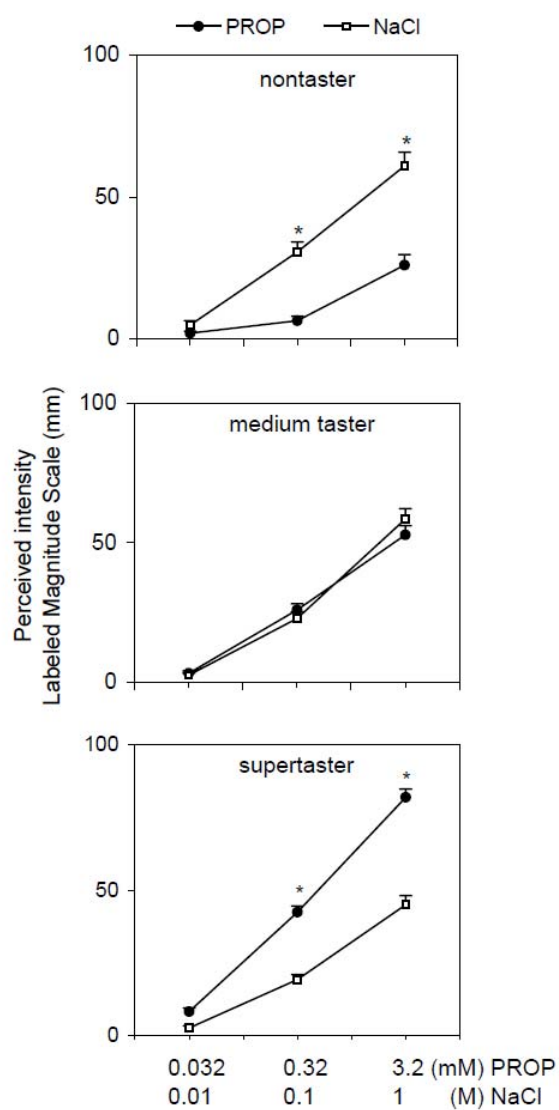
## RISULTATI

### Sensibilità gustativa al PROP

I soggetti sono stati classificati secondo il loro “taster status” come segue: 27.63% nontasters (n = 21); 36.84% medium tasters (n = 28); and 35.52% supertasters (n = 27). La fig. 9 mostra la valutazione della intensità percepita dopo stimolazione con le tre concentrazioni di PROP e le tre concentrazioni di NaCl nei gruppi “nontaster” , “medium tasters” e “supertaster”. ANOVA ha rilevato una significativa interazione a tre-vie del tipo di soluzione  $\times$  del “taster status”  $\times$  della concentrazione sulla valutazione dell’intensità della sensazione evocata ( $F[4,438] = 21.438$ ;  $P < 0.00001$ ) (Fig.9). Il test post-hoc di Tukey ha evidenziato una valutazione maggiore dell’intensità della percezione delle due concentrazioni più alte di PROP (0.032 e 0.32 mmoli/l) rispetto a quella delle due più alte concentrazioni di NaCl (0.1 e 1.0 M/l) nel gruppo dei “supertaster” ( $P = 0.000036$ ; Tukey test). Nel gruppo dei “nontaster” la valutazione evocata dalle due più alte concentrazioni di NaCl (0.1 e 1.0 M/l) è risultata maggiore rispetto a quella evocata dalle due concentrazioni più alte di PROP ( $P = 0.000036$ ; Tukey test). Nei “Medium tasters” la valutazione evocata dalle concentrazioni di NaCl è risultata sovrapponibile a quella evocata dalle soluzioni di PROP ( $P > 0.05$ ; Tukey test).

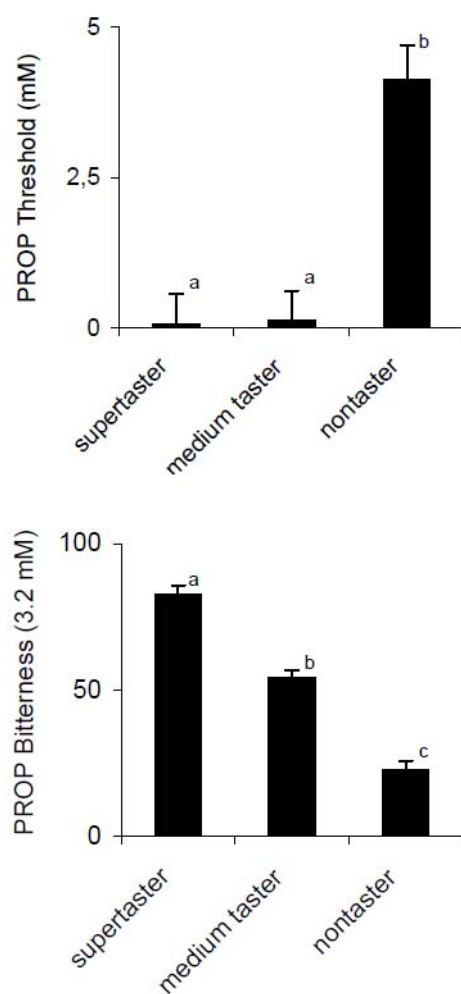
ANOVA ad 1-via ha mostrato che sia la soglia e la PROP bitterness (3,2mM) dipendono dal PROP “taster status” (soglia:  $F[2,69] = 18.260$ ;  $p < 0.0001$ ; bitterness:  $F[2,69] = 85.464$ ;  $p < 0.0001$ ) (Fig.10). Il confronto post-hoc ha dimostrato che i valori delle soglie determinati negli individui “nontasters” sono statisticamente più alti rispetto a quelli determinati negli individui degli altri due “tasters” gruppi ( $p = 0.000114$ ; Tukey test), ma non sono risultate differenze significative tra i valori

determinati nei “medium” e quelli dei “supertasters” ( $p > 0.05$ ; Tukey test). Diversamente i valori medi di PROP bitterness (3,2mM) determinati nei tre gruppi sono risultati statisticamente diversi uno dall’altro, cioè la bitterness dei “supertasters” era più alta di quella dei “medium tasters” che a sua volta era più alta di quella dei “nontasters” ( $p = 0.0001$ ; Tukey test).



**Figura 9.** Relazione tra l'intensità della percezione gustativa e la concentrazione dello stimolo in individui PROP nontasters ( $n = 21$ ), medium tasters ( $n = 28$ ) and supertasters ( $n = 27$ ). Tutti sono valori medi ( $\pm$ ES).

\* = differenza significativa tra valori corrispondenti ( $P = 0.000036$ ; Tukey test successivo ad ANOVA a tre vie).



**Fig 10.** Valori medi  $\pm$  ES di soglia per il PROP (PROP Threshold) e della PROP bitterness (3.2 mM) determinate in “supertasters” (n = 27), “medium tasters” (n = 28) and “nontasters” (n = 21). ANOVA a 1-via era usata per confrontare valori attraverso i “taster” gruppi ( $p < 0.0001$ ). Lettere differenti indicano differenze significative ( $p < 0.0001$ ; Tukey test).

### **Analisi molecolare del polimorfismo rs2274333 (A/G) del gene della gustina**

L'analisi molecolare del polimorfismo rs2274333 (A/G) del gene che codifica per la gustina ha mostrato che i tre gruppi differivano sulla base della distribuzione dei genotipi ( $\chi^2 = 24.334$ ;  $P = 5.2e-006$ ; Fisher's test) e della frequenza allelica ( $\chi^2 = 32.684$ ;  $P = 7.999e-008$ ; Fisher's test) (Tabella 1). In questo caso, il test post hoc ha permesso di discriminare tutti i gruppi uno dall'altro ( $\chi^2 > 10.254$ ;  $P < 0.006$ ; Fisher's test). I "supertasters" che hanno una frequenza molto alta del genotipo AA (85.19 %) e dell'allele A (92.6 %) sono risultati diversi dai "nontasters" che invece hanno una maggiore frequenza del genotipo GG (57.14 %) e dell'allele G (64.28 %) (differenza sulla base dei genotipi:  $\chi^2 = 26.053$ ;  $P = 0.000002$ ; differenza sulla base della frequenza allelica:  $\chi^2 = 34.563$ ;  $P = 0.000001$ ). L'allele A è risultato più frequente (69.6 4%) rispetto all'allele G (30.35 %) anche nel gruppo dei "medium tasters".

**Tabella 1** Distribuzione dei genotipi e frequenza allelica del polimorfismo rs2274333 (A/G) del gene che codifica per la gustina (CA6) in accordo con il “PROP taster status”.

	PROP status						<i>p</i>
	Supertaster		Medium taster		Nontasters		
<i>Genotipo</i>	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
AA	23	85.19	14	50.00	6	28.57	5.21e-006
GG	0	0	3	10.71	12	57.14	
AG	4	14.81	11	39.28	3	14.29	
<i>Allele</i>							
A	50	92.59	39	69.64	15	35.71	7.99e-008
G	4	7.40	17	30.35	27	64.28	

I valori di *p* derivano dal test di Fisher. *n* = 76



### **Analisi dell' effetto del polimorfismo rs2274333 (A/G) sulla funzione della gustina**

L'analisi effettuata con il software PSIREN ha mostrato che il polimorfismo rs2274333 (A/G) ha un effetto locale sulla struttura secondaria della gustina (CA6) (Fig. 11). La presenza dell'allele G nella sequenza nucleotidica determina nella struttura secondaria della proteina immediatamente a valle della Gly90 la comparsa di un beta foglietto (Fig. 11B) che invece risulta assente quando è presente l'allele A che produce il codone Ser (Fig. 11A). In aggiunta, l'analisi effettuata con il software GlobPlot ci ha mostrato che il dominio di 6 amino acidi, dall'83 all'87, quando è presente la Gly90 nella sequenza della proteina, sembra avere una forma disordinata che non risulta quando invece l'aminoacido Serina si trova nella stessa posizione.

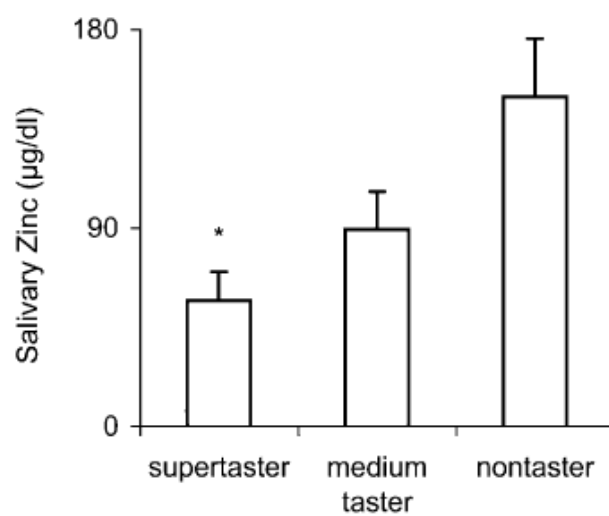
Nella fig. 12 è mostrata la concentrazione dello Zn nella saliva dei “supertasters”, “mediumtasters”, e “nontasters”. ANOVA ad 1-via ha mostrato che la concentrazione dello ione Zinco nella saliva varia con il “taster status” ( $F_{[2,72]} = 5.85$ ;  $P < 0.004$ ), e che i valori misurati sono significativamente più alti nei “nontasters” rispetto a quelli determinati nei “supertasters” ( $P = 0.003$ ; Tukey test).

Nella fig 13 sono mostrati esempi di immagini di lingua (parte sinistra della figura) registrate da individui dei tre genotipi conseguenti al polimorfismo rs2274333 (A/G) del gene della gustina e relativi ingrandimenti della parte anteriore sinistra della lingua è dove stato colorato un cerchietto di 6 mm di diametro per la definizione della densità delle papille fungiformi (parte destra della figura). In particolare, in A è rappresentata un'immagine registrata da un individuo omozigote AA, in B un'immagine registrata da un individuo eterozigote AG e in C da un'immagine registrata da individuo omozigote GG. Dall'osservazione di queste immagini appare evidente che gli individui con genotipo AA hanno una densità di

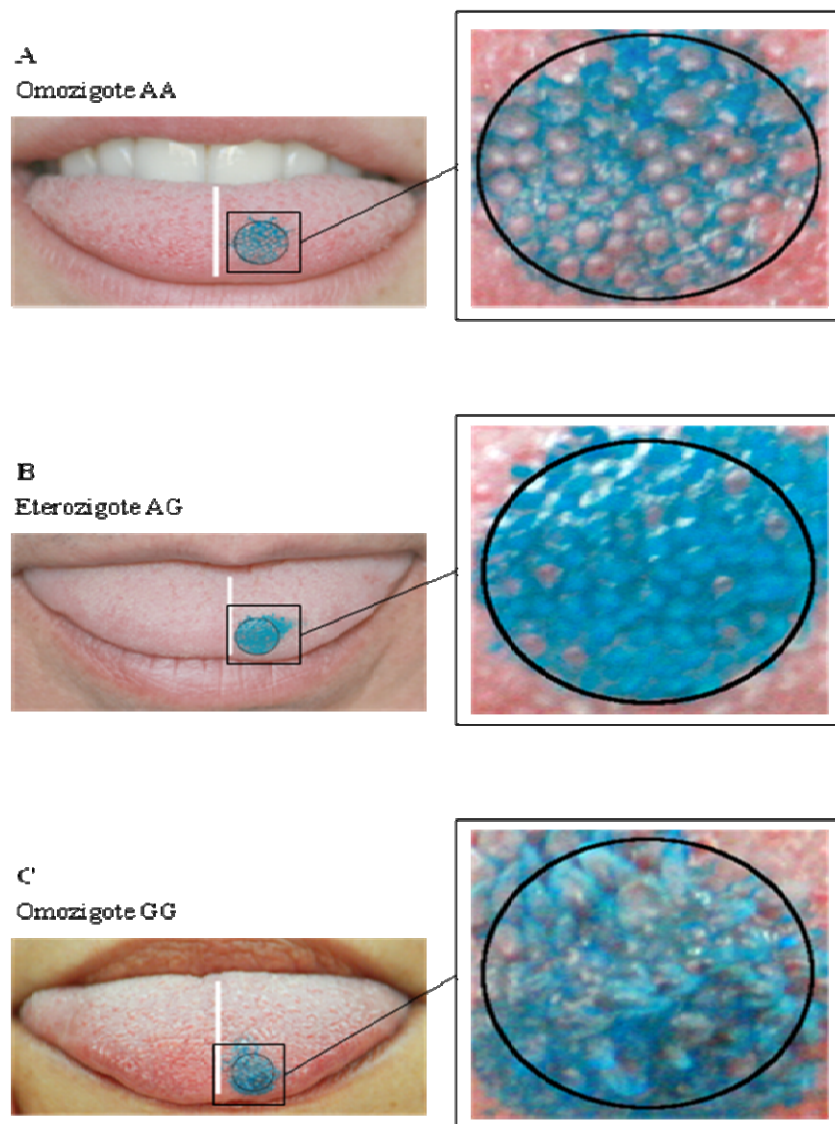
papille fungiformi maggiore rispetto agli individui con genotipo AG e GG, dove invece la densità delle papille risulta essere inferiore (fig.13 A,B,C).

La figura 14 mostra il valore medio  $\pm$  ES del numero di papille fungiformi/cm<sup>2</sup> determinato negli individui omozigoti AA, eterozigoti AG e omozigoti GG. L'analisi della varianza (ANOVA) a 1-via ha rilevato che la densità delle papille gustative è associata al polimorfismo rs2274333 (A/G) del gene della gustina (CA6) ( $F[4,60] = 11.845$ ;  $P = 0.00005$ ). Il test post-hoc di Tukey ha evidenziato una densità di papille fungiformi/cm<sup>2</sup> ( $93.575 \pm 6.015$ ) significativamente più alta negli individui con due alleli A rispetto agli individui omozigoti GG ( $p = 0.0000161$ ) che avevano una densità di  $38.924 \pm 10.009$  papille fungiformi/cm<sup>2</sup>. Gli individui omozigoti AA avevano una densità di papille fungiformi significativamente più alta anche rispetto a quella degli individui eterozigoti AG ( $p = 0.0342$ ) che avevano una densità di  $64.452 \pm 9.645$  papille fungiformi/cm<sup>2</sup>. La densità di questi ultimi non è risultata significativamente diversa rispetto a quella degli individui omozigoti GG ( $38.924 \pm 10.009$  papille fungiformi/cm<sup>2</sup>).

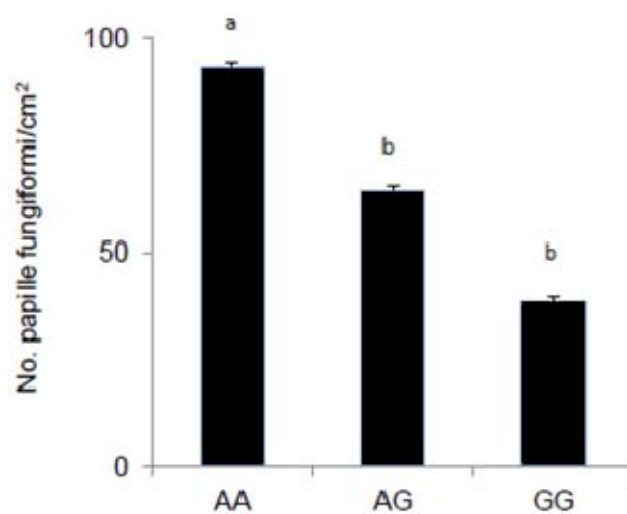




**Figura 12.** Valori medi  $\pm$  ES della concentrazione dello Zinco salivare nei supertasters ( $n = 27$ ), medium tasters ( $n = 28$ ) e nontasters ( $n = 21$ ). ANOVA ad 1-via è stata utilizzata per analizzare l'effetto del PROP taster status sulla concentrazione dello Zn salivare ( $P < 0.004$ ). \* = differenza significativa rispetto ai valori dei nontasters ( $P = 0.003$ ; Tukey test ).



**Fig 13.** Esempi di immagini di lingua (parte sinistra della figura) registrate da individui dei tre genotipi conseguenti al polimorfismo rs2274333 (A/G) del gene della gustina e relativi ingrandimenti della parte anteriore sinistra è dove stato colorato un cerchietto di 6 mm di diametro per la definizione della densità delle papille fungiformi (parte destra della figura). (A) individuo omozigote AA, (B) individuo eterozigote AG, (C) da un individuo omozigote GG.



**Figura 14 .** Densità delle papille gustative fungiformi (No./cm<sup>2</sup>) determinata in individui con genotipo omozigote AA (n = 36), eterozigote AG (n = 14) e omozigote GG (n = 13) per il gene della gustina. Tutti sono valori medi ( $\pm$  ES).

\* = lettere diverse indicano variazione significativa ( $P < 0.0386$ ; Tukey test successivo ad ANOVA a 1-via).

### **Analisi molecolare dei tre polimorfismi di singoli nucleotidi (SNPs) del *TAS2R38***

I polimorfismi di singoli nucleotidi del gene *TAS2R38* sono risultati associati al PROP taster status. Infatti, i tre “PROP taster” gruppi sono risultati differenti statisticamente sulla base della distribuzione dei genotipi e della frequenza degli aplotipi ( $\chi^2 > 50.00$ ;  $P < 1.00\text{e-}008$ ; Fisher’s test) (Tabella 2). La comparazione a due a due ha permesso di differenziare i “nontaster” dai “tasters” ( $\chi^2 > 50.00$ ;  $P < 1.00\text{e-}008$ ; Fisher’s test), mentre non sono risultate differenze significative tra i “supertasters” e i “medium tasters” sulla base della distribuzione dei loro genotipi ( $\chi^2 = 4.56$ ;  $P = 0.102$ ; Fisher’s test) e della frequenza degli aplotipi ( $\chi^2 = 2.95$ ;  $P = 0.22$ ; Fisher’s test). In particolare, il genotipo AVI/AVI e l’aplotipo AVI sono risultati il genotipo e l’aplotipo più rappresentato nei “nontasters” (rispettivamente il 90.48 % aveva genotipo AVI/AVI e il 95.24 % aveva almeno un aplotipo AVI). Nei “supertasters” e nei “medium tasters” sono risultati più rappresentati gli eterozigoti (il 51.85 % nei “supertasters” e il 78.57 % nei “medium tasters”) e gli omozigoti PAV (il 37.04 % nei “supertasters” e il 14.29 % nei “medium tasters”). Di conseguenza l’aplotipo PAV era rappresentato nel 66.67 % dei “supertasters” e nel 55.36 % dei medium tasters, mentre per l’aplotipo AVI era rappresentato nel 29.63 % dei “supertasters” e nel 42.86 % dei “medium tasters”. Come mostrato nella tabella 2 nel nostro panel sono stati anche determinati alcuni rari aplotipi (AAV and AAI).

**Tabella 2.** Distribuzione dei genotipi e frequenza degli aplotipi del *TAS2R38* in accordo con il “PROP taster status”.

	PROP status						<i>p</i>
	Supertaster		Medium taster		Nontasters		
<i>Genotipo</i>	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
PAV/PAV	10	37.04	4	14.29	0	0	<1.0e-008
AVI/AVI	1	3.70	1	3.57	19	90.48	
PAV/AVI	14	51.85	22	78.57	1	4.76	
PAV/AAV	2	7.41	0	0	0	0	
PAV/AAI	0	0	1	3.57	0	0	
AVI/AAI	0	0	0	0	1	1	
<i>Aplotipo</i>							
PAV	36	66.67	31	55.36	1	2.38	<1.0e-008
AVI	16	29.63	24	42.86	40	95.24	
AAV	2	3.70	0	0	0	0	
AAI	0	0	1	1.79	1	2.38	

I valori di *p* derivano dal test di Fisher. *n* = 76



### **Contributo del *TAS2R38* e del gene della gustina nella modulazione del fenotipo sensibilità al PROP**

L'analisi di Fisher attraverso i due loci polimorfici ha mostrato che tutti i gruppi differivano uno dall'altro sulla base della distribuzione dei genotipi ( $\chi^2 > 17.299$ ;  $P < 0.002$ ) e della frequenza allelica ( $\chi^2 > 16.005$ ;  $P < 0.003$ ).

Il metodo di Markov Chain ha evidenziato che i tre taster gruppi sono diversi statisticamente anche sulla base della distribuzione delle combinazioni dei genotipi dei due geni, *TAS2R38* e gene della gustina ( $p < 0.00001$ ) (Tabella 3). L'analisi post hoc ha permesso di discriminare i gruppi uno dall'altro ( $p \leq 0.04545$ ). In particolare, la condizione di omozigosi per entrambi i geni degli alleli associati a bassa sensibilità (AVI/AVI - GG) è risultata la più frequente (55 %) nei “nontasters” ( $p < 0.00001$ ; Markov Chain method). Nei “supertasters” le combinazioni dei genotipi maggiormente rappresentate erano due, la prima (48 %) l'omozigote per l'allele del gene della gustina associato ad alta sensibilità (AA) combinato con la condizione PAV eterozigote (AA - PAV/AVI), la seconda (32 %) l'omozigote AA associato all'omozigote PAV (AA - PAV/PAV). Nei “medium tasters”, la condizione di PAV eterozigote insieme a genotipi AA o AG del gene per la gustina (PAV/AVI - AA and PAV/AVI - AG) sono risultati i più frequenti (40.74 % and 37.04 %).

Il grafico a dispersione mostrato nella Fig.15 descrive la tipica correlazione lineare negativa tra la PROP bitterness e la soglia al PROP (PROP threshold) ( $r = -0.709$ ;  $p < 0.0001$ ). Gli individui sono identificati nel grafico in base al “taster status” e ai genotipi dei geni *TAS2R38* e della gustina. Gli individui “nontasters” omozigoti per gli alleli di entrambe i loci associati alla bassa sensibilità (AVI/AVI-GG), presentavano i valori di soglia più alti e mostrano i valori di intensità di bitterness più bassi, mentre gli individui con genotipo AVI/AVI-AA, mostrano un fenotipo meno

estremo. In contrapposizione gli individui “supertasters” con genotipo PAV/PAV-AA, quindi con la condizione di omozigosi per gli alleli associati ad alta sensibilità ad entrambe i loci, presentavano i valori di soglia più bassi e danno più elevate valutazioni di intensità di bitterness, mentre gli individui con la combinazione di genotipi PAV/AVI – AA mostrano un fenotipo meno sensibile. Infine i “medium tasters” con genotipo PAV/AVI - AA sembrano avere dei valori di soglia più bassi rispetto agli individui con genotipo PAV/AVI – AG.

La procedura GLM mostra il contributo dei due loci genici (*TAS2R38* e gene della gustina) nella modulazione quantitativa della “PROP bitterness”, il Global R Squared era 0.598. In particolare il modello applicato ha evidenziato un'associazione significativa tra la PROP bitterness e l'eterozigosi PAV/AVI (Partial Eta Squared = 0.274;  $p < 0.001$ ) e/o l'omozigosi PAV/PAV (Partial Eta Squared = 0.424;  $p < 0.001$ ). E' presente un'associazione significativa anche tra la PROP “bitterness” e la condizione di omozigosi AA (Partial Eta Squared = 0.128;  $p = 0.003$ ); mentre non è risultata una associazione tra la PROP bitterness e la condizione di eterozigosi AG (Partial Eta Squared = 0.033;  $p = 0.136$ ). Inoltre, la GLM analisi non ha evidenziato una interazione tra i due loci genici di nella modulazione della Bitterness.

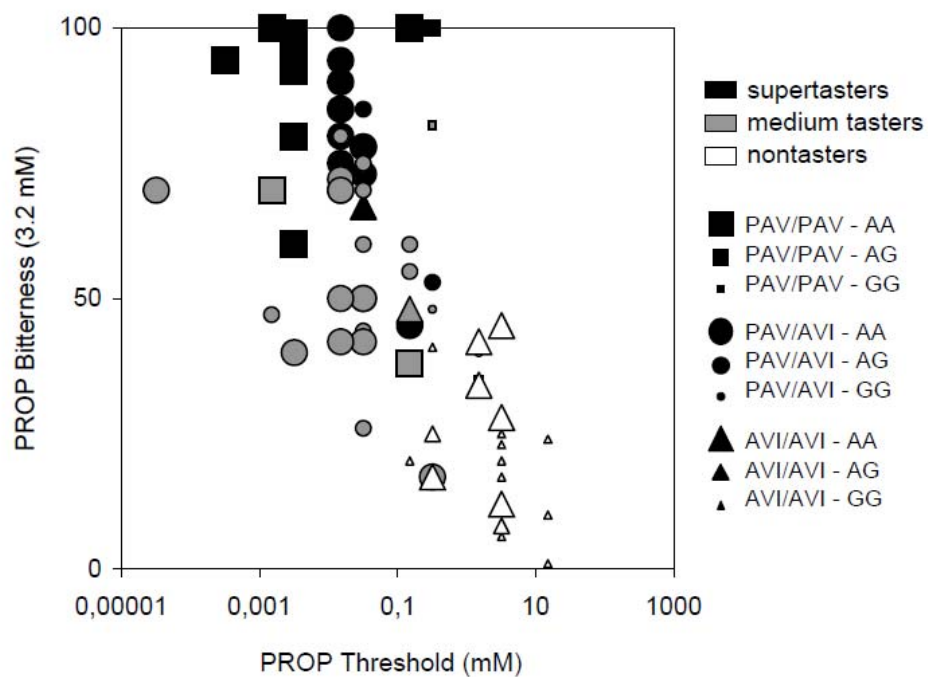
Il modello GLM ha definito anche il contributo dei due loci nella modulazione quantitativa della soglia al PROP, e in questo caso il valore del Global R Squared era di 0.413. Per le misure di soglia, l'analisi GLM ha mostrato un'associazione significativa tra la soglia e l'eterozigosi PAV/AVI (Partial Eta Squared = 0.129;  $p = 0.002$ ) o l'omozigosi PAV/PAV (Partial Eta Squared = 0.111;  $p = 0.005$ ), come anche l'eterozigosi AG (Partial Eta Squared = 0.103;  $p = 0.007$ ) o l'omozigosi AA (Partial Eta Squared = 0.149;  $p = 0.001$ ). Anche nel caso della definizione della soglia, non è stata trovata nessuna interazione significativa tra i due loci genici.

La tabella 4 mostra i valori medi ( $\pm$  SE) di PROP bitterness e di soglia osservati negli esperimenti e quelli attesi dalla GLM analisi relativi ad ogni combinazione genotipica dei geni *TAS2R38* e del gene della gustina. I valori attesi della PROP bitterness che hanno un range che va da 16.3 negli individui con genotipo AVI/AVI – GG a 83.9 negli individui con genotipo PAV/PAV – AA, hanno un elevato grado di sovrapposizione con quelli osservati (Global R Squared = 0.598). Il modello mostra anche che avere due copie dell'allele AA del gene della gustina determina un aumento della sensibilità al PROP in ogni genotipo *TAS2R38*. I valori attesi di soglia ottenuti con la analisi GLM sono risultati solo parzialmente sovrapposti con quelli osservati (Global R Squared = 0.413). In questo caso il modello ha mostrato che un singolo allele A del gene della gustina è sufficiente a determinare riduzione del valore soglia. Quest'ultimo dato è confermato dal fatto che esiste una significativa associazione tra la condizione di eterozigosi AG e la soglia (Partial Eta Squared = 0.103;  $p = 0.007$ ), ma non tra l'eterozigosi AG e la bitterness (Partial Eta Squared = 0.033;  $p = 0.136$ ).

**Tabella 3.** Distribuzione delle combinazioni dei genotipi del *TAS2R38* e del gene della gustina in accordo al PROP taster status.

Genotipo	PROP status						p-value <sup>1</sup>
	Supertaster		Medium taster		Nontasters		
	n	%	n	%	n	%	
AVI/AVI - GG	0	0	0	0	11	55.00	< 0.0001
AVI/AVI - AG	0	0	0	0	2	10.00	
AVI/AVI - AA	1	4.00	1	3.70	6	30.00	
PAV/AVI - GG	0	0	1	3.70	1	5.00	
PAV/AVI - AG	2	8.00	10	37.04	0	0	
PAV/AVI - AA	12	48.00	11	40.74	0	0	
PAV/PAV - GG	0	0	2	7.41	0	0	
PAV/PAV - AG	2	8.00	0	0	0	0	
PAV/PAV - AA	8	32.00	2	7.41	0	0	

I valori di *p* derivano dal metodo di Markov Chain. *n* = 72



**Fig. 15.** Grafico a dispersione raffigurante la relazione tra la PROP bitterness e la soglia al PROP ( $r = -0.71$ ;  $p < 0.0001$ ; correlazione lineare). Gli individui ( $n = 72$ ) sono identificati in base al loro PROP taster status e ai genotipi di *TAS2R38* e del gene della gustina (CA6).

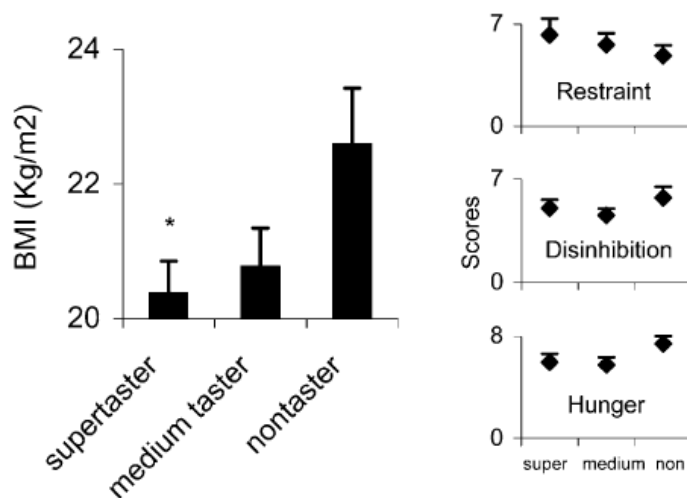
**Tabella 4.** Valori di PROP bitterness e di soglia in accordo con i loci genici *TAS2R38* e gene della gustina (CA6).

<i>Genotipo</i>	PROP Bitterness		PROP Threshold	
	<i>Obs</i>	<i>Exp</i>	<i>Obs</i>	<i>Exp</i>
AVI/AVI - GG	17.9 ± 3.34	16.3	5.88 ± 1.80	5.23
AVI/AVI - AG	16.5 ± 8.50	27.6	1.76 ± 1.44	2.46
AVI/AVI - AA	36.6 ± 6.30	36.0	1.64 ± 0.50	2.36
PAV/AVI - GG	44.0 ± 4.00	47.0	0.91 ± 0.59	2.78
PAV/AVI - AG	58.2 ± 4.96	58.3	0.07 ± 0.03	0.01
PAV/AVI - AA	67.0 ± 4.38	66.7	0.04 ± 0.01	-0.09
PAV/PAV - GG	58.5 ± 23.50	64.2	0.91 ± 0.59	2.62
PAV/PAV - AG	87.5 ± 12.50	75.6	0.17 ± 0.15	-0.15
PAV/PAV - AA	82.7 ± 6.57	83.9	0.03 ± 0.02	-0.25
<i>Global R Squared</i>	0.598		0.413	

Valori medi di PROP bitterness (3.2 mM) e di soglia (mM) osservati (Obs) (± SE) e attesi (Exp) mediante l'analisi GLM. *n* = 72

### Indice di massa corporea (BMI) e “PROP taster status”

Il BMI medio ( $\pm$  SEM) era in un normale range di peso per tutti e tre i gruppi “taster” (Fig.16). Considerando i tre fattori del questionario di Stunkard e Messick come covariabili, ANCOVA ad una via, ha rilevato che il BMI varia con il taster status ( $F[2,60] = 3.19$ ;  $P < 0.048$ ). Il confronto post-hoc ha mostrato che il BMI dei “nontasters” è più alto di quello dei “supertasters” ( $P = 0.042$ ; Tukey test). Sebbene sia possibile notare dal grafico valori di controllo cognitivo più elevati negli individui “supertasters” e valori più elevati di disinibizione e voracità nei “nontasters”, i punteggi relativi al controllo alimentare, alla disinibizione e alla voracità non erano statisticamente differenti tra i soggetti appartenenti ai tre gruppi ( $P > 0.05$ ; Tukey test).



**Figure 16.** Valori medi  $\pm$  ES dell'indice di massa corporea (BMI) misurato nei “supertasters” ( $n = 27$ ), “medium tasters” ( $n = 28$ ) and “nontasters” ( $n = 20$ ). L'analisi della covarianza ad una via (ANCOVA) è stata utilizzata per confrontare le differenze di BMI tra i taster groups ( $P < 0.048$ ). I tre fattori del questionario di Stunkard and Messick, restrizione cognitiva, disinibizione e voracità (mostrati come valori medi  $\pm$  ES nella parte destra della figura), erano considerati come covariabili nell'analisi ANCOVA.

\* = differenza significativa rispetto ai valori dei nontaster ( $P = 0.042$ ; Tukey test).

## Discussione

Lo scopo primario di questo lavoro era quello di caratterizzare altri fattori, oltre alle varianti del *TAS2R38*, determinanti nella definizione delle variabilità individuali della sensibilità al PROP che viene usata come un indice generale della percezione chemosensoriale in grado di condizionare le preferenze alimentari e quindi lo stato nutrizionale.

Per la prima volta noi abbiamo dimostrato che la sensibilità gustativa al PROP è inversamente correlata alla concentrazione dello zinco salivare e direttamente associata con il polimorfismo rs2274333 (A/G) nell'esone 3 del gene della gustina (CA6) che sembra essere legato con la capacità della proteina di legare lo zinco. È noto che i polimorfismi genetici rappresentano un meccanismo attraverso il quale gli individui mostrano variazioni funzionali all'interno di un range fisiologico [122]. Un'analisi comparativa del polimorfismo rs2274333 ci ha permesso di associare la più alta sensibilità al PROP dei supertasters al genotipo AA e all'allele A, la più bassa sensibilità al PROP dei nontasters al genotipo GG e all'allele G, e la moderata sensibilità al PROP dei "medium tasters" alla presenza di almeno un allele A.

I nostri risultati suggeriscono che il polimorfismo rs2274333 (A/G) influenza il legame dello zinco alla gustina (CA6). L'attività della gustina dipende dalla presenza dello zinco a livello del sito attivo della proteina [118,119], ed è stato dimostrato che una sua piena attività funzionale è cruciale per la funzione gustativa [116,117,120,121]. Lo zinco strettamente legato alla gustina è complessato all'enzima via tre residui di istidina [139]. Due di questi residui istidinici sono codificati dal codone 111 e 113 dell'esone 3, mentre il terzo residuo è codificato dal codone 138 dell'esone 4 del gene della gustina (CA6) [140]. La presenza di un  $\beta$ -foglietto immediatamente a valle della Gly90 nella struttura secondaria della proteina



e di una regione di disordine dal residuo amminoacidico 83 al residuo amminoacidico 87 immediatamente a monte della stessa Gly, ci ha portato a suggerire che si possa verificare una modificazione strutturale del sito attivo della proteina che potrebbe causare una riduzione del legame dello zinco al suo sito attivo. E' stato dimostrato che le proteine intrinsecamente disordinate o non strutturate si trovano in uno stato conformazionale altamente flessibile in gran parte privo di elementi strutturali secondari e contatti terziari [141]. Poichè l'esone 3 codifica per vari residui amminoacidici del sito attivo, incluse due delle tre istidine implicate nel legame con lo zinco [140,142] noi abbiamo ipotizzato che il residuo amminoacidico Ser in posizione 90, osservato nei "supertasters", determinerebbe una geometria ottimale del sito attivo della proteina che favorirebbe il legame con lo zinco. Al contrario, la presenza della Gly, osservata nei "nontasters", potrebbe rendere difficoltoso il legame dello zinco al sito catalitico della proteina influenzando così la sua attività enzimatica. Quindi, l'elevata concentrazione di zinco nella saliva dei "nontasters" potrebbe essere correlata con una geometria non ottimale del sito attivo che rende difficile il legame dello zinco alle istidine 111 e 113. Questa ipotesi, potrebbe spiegare le risposte contraddittorie ottenute dopo il trattamento con zinco nei pazienti con ridotta sensibilità gustativa come riportato da Henkin et al [117]. I pazienti che presentano una resistenza al trattamento con lo zinco nel lavoro Henkin et al [117], potrebbero avere il genotipo GG e quindi non essere in grado di legare lo zinco per un ottimale funzionamento della gustina.

Nel nostro panel abbiamo trovato alcuni individui "nontasters" con genotipo AA. La bassa sensibilità gustativa di questi individui nonostante il loro genotipo potrebbe essere spiegata da una ridotta espressione genica o da altri fattori che potrebbero contribuire a una diminuita sensibilità. Tra questi fattori dovrebbero essere

considerati altri costituenti organici salivari che potrebbero giocare un ruolo importante nella funzione gustativa agendo come trasportatori dello stimolo, idrofobico, verso i siti recettoriali. Ulteriori studi sono in corso per verificare questa ipotesi.

Considerando che è noto che il PROP “nontasters status” è associato con una ridotta densità di papille fungiformi [63,65,67] ed è stato ipotizzato che la gustina possa fungere da fattore trofico per lo sviluppo e la crescita delle papille gustative [117], i nostri risultati suggeriscono che l’associazione tra la mutazione nella gustina (CA6) e il “nontaster status” potrebbe fornire una spiegazione per la ridotta densità di papille negli individui di questo gruppo così come per la generale riduzione dell’abilità chemosensoriale dimostrata in questi individui.

I risultati da noi ottenuti sulla densità delle papille gustative negli individui genotipizzati per il polimorfismo rs2274333 (A/G) del gene della gustina (CA6) confermano questa ipotesi. Infatti, un’analisi comparativa ha mostrato che la densità delle papille gustative è più elevata negli individui con genotipo AA rispetto a quella degli individui omozigoti GG e a quella degli eterozigoti. Quindi, l’associazione tra la mutazione della gustina (CA6) e la ridotta densità di papille gustative negli individui “nontasters” GG che dovrebbero avere una gustina meno funzionale, fornisce la prima spiegazione meccanicistica del perché i PROP nontasters (con alta frequenza dell’allele G) sono insensibili, rispetto ai PROP tasters, a una vasta gamma di stimoli orali anche diversi dalle tiouree, e del fatto che i PROP supertaster, che hanno un’elevata frequenza dell’allele A, hanno una maggiore densità di papille gustative rispetto ai nontaster.

Nella seconda fase di questo lavoro lo scopo è stato quello di determinare come gli aplotipi *TAS2R38* e i genotipi del polimorfismo rs2274333 (A/G) del gene della

gustina possono co-operare nella modulazione del PROP fenotipo. L'analisi della distribuzione genotipica e delle frequenze alleliche del *TAS2R38* e del gene della gustina in accordo al PROP status ha mostrato che il locus *TAS2R38* distingue solo i "tasters" dai "nontasters", mentre il locus del gene della gustina differenzia tutti e tre i gruppi PROP taster. Inoltre, i risultati di questa analisi con quelli dell'analisi della distribuzione delle combinazioni dei genotipi dei due loci ha mostrato che, mentre il locus *TAS2R38* caratterizza geneticamente gli individui "nontasters", il locus del gene della gustina caratterizza i "supertasters". Infatti, la più bassa sensibilità al PROP nei "nontasters" è fortemente associata con la variante non sensibile AVI del *TAS2R38* (95 % dei "nontasters" porta l'aplotipo AVI e il 90 % sono AVI omozigoti) in quelli con almeno 1 allele G del gene della gustina. Dall'altro lato, la più elevata sensibilità al PROP nei "supertasters" è fortemente associata con l'allele A e il genotipo AA (93 % dei supertasters porta l'allele A e l'85 % sono A omozigoti).

Inoltre, abbiamo eseguito un'analisi quantitativa del contributo dei loci *TAS2R38* e del gene della gustina nel modulare il PROP fenotipo utilizzando misure di soglia, le quali stabiliscono l'abilità nel discriminare basse concentrazioni dello stimolo, e valutazioni dell'intensità soprasoglia le quali saggiavano l'intensità gustativa ad alte concentrazioni. L'analisi GLM ha mostrato che i loci *TAS2R38* e del gene della gustina hanno effetti indipendenti nel modulare il PROP fenotipo e che i due loci incidono per il 60% sulla variabilità fenotipica della PROP bitterness ma solo per il 40% sulla variabilità della soglia al PROP. Questi risultati hanno indicato che vi possano essere altri fattori ancora sconosciuti che potrebbero essere rilevanti nel percepire soprattutto le basse concentrazioni di PROP.

La forte associazione tra la PROP bitterness ed il *TAS2R38* suggerisce che le valutazioni dell'intensità del PROP sono principalmente determinata dal locus di *TAS2R38* (rispetto al locus del gene della gustina). Questi risultati sono coerenti con alcuni studi che, usando varianti di recettori umani funzionalmente espressi, hanno dimostrato che la variante PAV del *TAS2R38* è necessaria per rispondere a soluzioni crescenti di PROP [76]. I nostri risultati non escludono il coinvolgimento di altre mutazioni genetiche che come è noto possono giocare un ruolo importante nel sentire il gusto del PROP [66, 100].

La simile associazione tra i due loci e i valori di soglia ha indicato che entrambi i loci, *TAS2R38* e il gene della gustina, sono importanti per discriminare basse concentrazioni dello stimolo. In particolare, la presenza di un singolo allele A nel gene della gustina è sufficiente per gli individui a esibire diminuzioni di soglia, indipendentemente dal genotipo *TAS2R38*, mentre due alleli A (AA) sono necessari per determinare aumenti di intensità di bitterness. Quindi, noi speculiamo che l'abilità a percepire basse concentrazioni di PROP potrebbe essere legata all'attività della gustina, la quale gioca un ruolo importante nello sviluppo e nella crescita delle papille gustative.

I nostri risultati inoltre aiutano a spiegare alcune incongruenze riportate in letteratura come per esempio individui AVI omozigoti che presentano una sensibilità al PROP più alta di quanto ci si aspetterebbe in base al loro genotipo, o individui eterozigosi PAV/AVI che rispondono come “supertasters” [71,74].

In ultimo, la relazione tra il PROP taster status e indice di massa corporea (BMI) è stata spesso studiata, ma con risultati contraddittori [60,76,98–104] implicando che altri fattori possano essere cruciali nel determinare la generale relazione tra sensibilità gustativa e comportamento alimentare, e che una variazione del BMI è

solo una delle possibili conseguenze di una ridotta sensibilità gustativa. Sebbene la nostra popolazione fosse composta da individui normopeso, i nostri risultati hanno mostrato un'inversa relazione tra la sensibilità al PROP e il BMI, e hanno confermato che i fattori cognitivi che condizionano il comportamento alimentare possono avere un ruolo molto importante nella determinazione di questa relazione.

In conclusione, i nostri risultati ricapitolando precedenti lavori che mostrano che il *TAS2R38* non può spiegare da solo l'alta sensibilità gustativa dei supertasters, estendono la nostra conoscenza identificando nel polimorfismo rs2274333 (A/G) del gene della gustina un nuovo candidato che, modulando l'attività funzionale della proteina quale fattore trofico che promuove l'accrescimento e lo sviluppo delle papille gustative, può spiegare l'elevata abilità dei supertasters a discriminare una vasta gamma di stimoli orali amari e non amari, le differenze individuali della percezione chemosensoriale, le preferenze alimentari (incluse quelle nei confronti dei grassi) e le differenze di BMI che sono riportate qui come anche in altri lavori [29,60,62,67,69,70,75,79-83, 85,86,89,90,92,93,98-100] .

## **Bibliografia**

1. Avenet P. and Lindermann B. Perspectives of taste reception. *J Membr. Biol* 1998;112:1-8.
2. Bigiani A., Delay R.J., Chaudhair N., Kinnamon S.C., Roper S.D. Responses to glutamate in rat taste cells. *J. Neurophysiol* 1997;77:3048-3050.
3. Gilbertson T. A., Fontenot D.T., Loiu L., Zhang H., Monroe M. T. Fatty acid modulation of K<sup>+</sup> channels in taste receptors cell: Gustatory cues for dietary fat . *Am.J. Physiol* 1997;272:C1203- C1210.
4. McLaughlin S.K., McKinnon P.J., Robichon A., Spikofsky N., Margolskee R.F. Gustducine and trasducin : A tale of 2 G-proteins. *CIBA foundation Symposia* 1993;179:186-200.
5. Schiffman S.S., Lockhead E., Maes F.W. Amiloride reduces the taste intensity of Na<sup>+</sup> and Li<sup>+</sup> salts sweeteners. *Pro Nat Ac Sci* 1983;80:6136-6140.
6. Kinnamon S.C., Dionne V.E., Beam K. G., Apical location of K<sup>+</sup> Channels in taste cells provides the basis for sour taste trasdution *Pro Nat Ac Sci, USA* 1988;85:7023-7027.
7. Kurihara K., Recent progress in taste receptor mechanisms in Umami: A Basic Taste, ed. by Y. Kuwamura and M.R. Kare. New York 1987: Dekker. *Neuroscience & Biobehavioral* 1999;23(3):423-438.
8. Wong G.T., Gannon K.S., Margolskee R.F. Trasduction of bitter and sweet taste by gustducin. *Nature* 1996;381:796-800.
9. Drayna D. Human Taste Genetics. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2005;6:217–35

10. DeSimone JA, Heck GL, Mierson S, DeSimone SK. The active ion transport properties of canine lingual epithelia in vitro. Implications for gustatory transduction. *Journal of General Physiology*. 1984;83:633-656.
11. Lindemann, B. Taste reception. *Physiol. Rev* 1996;76:718–766
12. Lohse P, Chahrokh-Zadeh S, Seidel D. The acid lipase family: Three enzymes one highly conserved gene structure. *J. Lipid Res* 1997;38:880-891.
13. Fukuwatari T., Kawada T., Tsuruta M., Hiaroka T., Sugimoto E., Fushiki T. Expression of the putative membrane fatty acid transporter (FAT) in taste buds of circumvallate papillae in rats. *FEBS Letters* 1997;414:461-464.
14. Gilbertson T. A., Fontenot D.T., Loiu L., Zhang H., Monroe M. T. Fatty acid modulation of K<sup>+</sup> channels in taste receptors cell: Gustatory cues for dietary fat . *Am.J. Physiol* 1997;272:1203- 1210.
15. Fish, H. S., Malone, P. D. & Richter, C. P. The anatomy of the tongue of the domestic Norway rat. I. The skin of the tongue; the various papillae, their number and distribution. *Anatomical Record* 1944;89:429-440.
16. Oakley B. On the specification of taste neurons in the rat tongue. *Brain Res* 1988;75:85–96.
17. Whiteside B. Nerve overlap in the gustatory apparatus of the rat. *Journal of Comparative Neurology* 1927;44:363-377.
18. Zalewski, A. A. Role of nerve and epithelium in the regulation of alkaline phosphatase activity in gustatory papillae. *Experimental Neurology* 1969;23:18-28.
19. Moore, K. L, Baltimore, MD. Clinically oriented anatomy. Williams & Wilkins 1992:3rd ed.

20. Cleaton-Jones, P. A denervation study of taste buds in the soft palate of the albino rat. *Archives of Oral Biology* 1971;21:19-82.
21. Miller I.J. Jr. Gustatory receptors of the palate. In Y. Katsuki, M. Sato, S. Takagi, and Y. Oomura (Eds.). *Food intake and cheinical senses*. Tokyo: Univ. of Tokyo 1977;173-186.
22. Miller I. J.Jr. & Spangler, K. M. Taste bud distribution and innervation on the palate of the rat. *Chemical Senses* 1982;7:99-108.
23. Contreras, R. J., Beckstead, R. M., & Norgren, R. The central projections of the trigeminal, facial, glossopharyngeal and vagus nerves: An autoradiographic study in the rat. *Journal of the Autonomic Nervous System* 1982;6:303-322.
24. Hamilton, R. B., & Norgren, R. Central projections of gustatory nerves in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 1984;222:560-577.
25. Travers, S. P. Orosensory processing in neural systems of the nucleus of the solitary tract. In: S. A. Simon and S. D. Roper (Eds.), *Mechanisms of Taste Transduction*. Boca Raton, FL: CRC Press, pp 1993;339-394.
26. Soranzo N, Bufo PC, Sabeti JF et al. Positive selection on a high-sensitivity allele of the human bitter taste receptor TAS2R16. *Curr Biol* 2005;15:1257-65.
27. Weiffenbach JM, Baum BJ, Burghauser R. Taste threshold: quality specific variation with human aging. *J Gerontol* 1982;37:372-7.
28. Henkin RI, Martin BM, Agarwal RP. Efficacy of exogenous oral zinc in treatment of patients with carbonic anhydrase VI deficiency. *Am J Med Sci* 1999;318:392-405.



29. Yeomans MR, Tepper BJ, Rietzschel J, Prescott J. Human hedonic responses to sweetness: role of taste genetics and anatomy. *Physiol Behav* 2007;91:264-73.
30. Tepper BJ, Neilland M, Ullrich NV, Koelliker Y, Belzer LM. Greater energy intake from a buffet meal in lean, young women is associated with the 6-n-propylthiouracil (PROP) nontaster phenotype. *Physiol Behav* 2011;56(1):104-110.
31. Curtis KS, Stratford JM, Contreras RJ. Estrogen increases the taste threshold for sucrose in rats. *Physiol Behav* 2005;86:281-6.
32. Schiffman, S.S. Taste and smell losses in normal aging and disease. *The Journal of the American Medical Association*, 1997;278:1375-1381
33. Schiffman SS. "Perception of taste and smell in elderly persons". *Crit Rev Food Sci Nutr* 1993;33:17-26.
34. Schiffman SS, Graham BG. Taste and smell perception affect appetite and immunity in the Elderly *European Journal of Clinical Nutrition* 2000;54(3):54-63
35. Tepper BJ. Nutritional implications of genetic taste variation: the role of PROP sensitivity and other taste phenotypes. *Annu Rev Nutr* 2008;28:367-88.
36. Del Rio JA, Arcas MC, Benavente O, Sabater F, Ortuño A. Changes of polymethoxylated flavones levels during development of *Citrus aurantium* (cv. Sevillano) fruits. *Planta Medica* 1998;64:575-6.

37. Drewnowski A, Gomez-Carneros C. Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review *American Journal of Clinical Nutrition*, 2000;72(6):1424-1435.
38. Fenwick GR, Griffiths NM, Heaney RK. Bitterness in Brussels sprouts (*Brassica oleracea* L var *gemnifera*): the role of glucosinolates and their breakdown products. *J Sci Food Agric* 1983;34:73-80.
39. Fenwick GR, Heaney RK, Mullin WJ. Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr* 1983;18:123-201.
40. Kingsbury, J. M. *Poisonous plants of the United States and Canada*. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, N.J., USA. 1964;626.
41. D'Archivio. 2007 *Ann Ist super Sanità* 2007;43(4):348-361
42. Roper SD. Signal transduction and information processing in mammalian taste buds. *Pflugers Arch* 2007;454:759-776.
43. Behrens M, Meyerhof W. Mammalian bitter taste perception. 2009;47:203-20.
44. Shi P, Zhang J, Yang H, Zhang YP. Adaptive diversification of bitter taste receptor genes in mammalian evolution. *Mol Biol Evol* 2003;20:805-814.
45. Wiener A, Shudler M, Levit A, Niv M. Y. BitterDB: a database of bitter compounds  
Nucleic Acids Research, 2011
46. Behrens M, Meyerhof W. Bitter taste receptors and human bitter taste perception. *Cell. Mol. Life Sci.* 2006;63:1501-1509
47. Meyerhof W, Batram C, Kuhn C, Brockhoff A, Chudoba E, Bufe, Appendino G, Behrens M. The Molecular Receptive Ranges of Human

TAS2R Bitter Taste Receptors. Oxford Journals Life Sciences & Medicine  
Chemical Senses 2010;35(2):157-170

48. Kim UK, Jorgenson E, Coon H, Leppert M, Risch N, Drayna D. Positional cloning of the human quantitative trait locus underlying taste sensitivity to phenylthiocarbamide. *Science* 2003;299:1221-5.
49. Reed DR, Zhu Gu, Bresli PAS, Duke FF, Henders AK, Campbell MJ, Montgomery GW, Medland SE, Martin NG, Wright J. The perception of quinine taste intensity is associated with common genetic variants in a bitter receptor cluster on chromosome 12. *Human Molecular Genetics*, 2010;19(21):4278–4285.
50. Pronin AN, Xu H, Tang H, Zhang L, Li Q, Li X. Specific alleles of bitter receptor genes influence human sensitivity to the bitterness of aloin and saccharin. *Curr Biol*. 2007;21(17):16:1403-8.
51. Roudnitzky N, Bufe B, Thalmann S, Kuhn C, Gunn HC, Xing C, Crider BP, Behrens M, Meyerhof W, Wooding SP. Genomic, genetic and functional dissection of bitter taste responses to artificial sweeteners. *Hum Mol Genet*. 2011;20(17):3437-49.
52. Hayes JE, Wallace MR, Knopik VS, Herbstman DM, Bartoshuk LM, Duffy VB. Allelic variation in TAS2R bitter receptor genes associates with variation in sensations from and ingestive behaviors toward common bitter beverages in adults. *Chem Senses*. 2011;36(3):311-9.
53. Guo SW, Reed DR. The genetics of phenylthiocarbamide perception. *Ann Hum Biol* 2001;28:111-42.
54. Harris H, Kalmus H. Chemical sensitivity in genetical differences of taste sensitivity. *Ann*

- Eugen 1949;15:32-45.
55. Fahey JD, Zalcmann AT, Talalay P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochem* 2001;56:5-51.
  56. Delange F. The role of iodine in brain development. *Proc Nutr Soc* 2000;59:75-79.
  57. Wooding S, Kim UK, Bamshad MJ, Larsen J, Jorde LB, et al. Natural selection and molecular evolution in PTC, a bitter-taste receptor gene. *Am. J. Hum. Genet* 2004;74:637-46.
  58. Fox AF. The relationship between chemical constitution and taste. *Proc Natl Acad Sci USA* 1932;18:115-20.
  59. Blakeslee AF, Fox AL. Our different taste worlds. *J Hered* 1932;23:97-107.
  60. Tepper BJ, Koelliker Y, Zhao L, Ullrich NV, Lanzara C, d'Adamo P, Ferrara A, Ulivi S, Esposito L, Gasparini P. Variation in the bitter-taste receptor gene TAS2R38, and adiposity in a genetically isolated population in Southern Italy. *Obesity* 2008;16(10):2289-95.
  61. Prodi DA, Drayna D, Forabosco P, Palmas MA, Maestrone GB, Piras D, Pirastu M, Angius A. Bitter taste study in a sardinian genetic isolate supports the association of phenylthiocarbamide sensitivity to the TAS2R38 bitter receptor gene. *Chem Senses* 2004;29(8):697-702.
  62. Bartoshuk LM. The biological basis of food perception and acceptance. *Food Qual Prefer* 1993;4:21-32.
  63. Bartoshuk LM, Duffy VB, Miller IJ. PTC/PROP tasting: anatomy, psychophysics, and sex effects. *Physiol Behav* 1994;56:1165-71.

64. Padiglia A, Zonza A, Atzori E, Chillotti C, Calo' MC, Tepper BJ , et al. Sensitivity to 6-n-propylthiouracil (PROP) is associated with gustin (CA6) gene polymorphism, salivary zinc and BMI in humans. *Am J Clin Nutr* 2010;92:539-45.
65. Tepper BJ, Cao J, Christensen CM. Development of brief methods to classify individuals by PROP taster status. *Physiol Behav* 2001;73:571-7.
66. Zhao L, Kirkmeyer SV, Tepper BJ. A paper screening test to assess genetic taste sensitivity to 6-n-propylthiouracil. *Physiol Behav* 2003;78:625-33.
67. Tepper BJ, Nurse RJ. PROP taster status is related to the perception and preference for fat. *Ann NY Acad Sci* 1998;855:802-4.
68. Bartoshuk LM, Duffy VB, Lucchina LA, Prutkin JM, Fast K. PROP (6-n-propylthiouracil) supertasters and the saltiness of NaCl. *Ann NY Acad Sci* 1998;855:793-6.
69. Duffy VB, Bartoshuk LM. Food acceptance and genetic variation in taste. *J Am Diet Assoc* 2000;100:647-55.
70. Duffy VB, Davidson AC, Kidd JR, Kidd KK, Speed WC, Pakstis AJ, Reed DR, Snyder DR, Bartoshuk LM. Bitter receptor gene (TAS2R38), 6-n-propylthiouracil (PROP) bitterness and alcohol intake. *Alcohol Clin Exp Res* 2004;28:1629-37.
71. Hayes JE, Bartoshuk LM, Kidd JR, Duffy VB. Supertasting and PROP bitterness depends on more than the TAS2R38 gene. *Chem Senses* 2008;33:255-65.
72. Bajec MR, Pickering GJ. Thermal taste, PROP responsiveness, and perception of oral sensations. *Physiol Behav*. 2008;95(4):581-90

73. Yeomans MR, Prescott J, Gould NJ. Acquired hedonic and sensory characteristics of odours: influence of sweet liker and propylthiouracil taster status. *Q J Exp Psychol* 2009;62(8):1648-64.
74. Bufe B, Breslin PA, Kuhn C, Reed DR, Tharp CD, Slack JP, et al. The molecular basis of individual differences in phenylthiocarbamide and propylthiouracil bitterness perception. *Curr Biol* 2005;15:322-7.
75. Tepper BJ, Nurse RJ. Fat perception is related to PROP taster status. *Physiol Behav* 1997;61:949-54.
76. Yackinous C, Guinard JX. Relation between PROP taster status and fat perception, touch, and olfaction. *Physiol Behav* 2001;72:427-37.
77. Essick GK, Chopra A, Guest S, McGlone F. Lingual tactile acuity, taste perception, and the density and diameter of fungiform papillae in female subjects. *Physiol Behav*. 2003;80:289–302.
78. Delwiche JF, Buletic Z., Breslin A.S Relationship of papillae number to bitter intensity of quinine and PROP within and between individuals. *Physiology & Behavior* 2001;74:329 - 337
79. Bartoshuk LM. Bitter taste of saccharin: related to the genetic ability to taste the bitter substance 6 n propylthiouracil (PROP) *Science* 1979;205:934-5.
80. Bartoshuk LM, Rifkin B, Marks LE, Bars P. Taste and aging. *J Gerontol* 1986;41:51-7.
81. Bartoshuk LM, Rifkin B, Marks LE, Hooper JE. Bitterness of KCl and benzoate : related to PTC/PROP. *Chem Senses* 1988;13:517-28.

82. Bartoshuk LM, Fast K, Karre TA, Marino S, Price RA, Reed DA. PROP supertasters and the perception of sweetness and bitterness. *Chem Senses* 1992;17:594.
83. Bartoshuk LM, Duffy VB, Lucchina LA, Prutkin JM, Fast K. PROP (6-n-propylthiouracil) supertasters and the saltiness of NaCl. *Ann NY Acad Sci* 1998;855:793-6.
84. Duffy VB, Bartoshuk LM, Lucchina LA, Snyder DJ, Tym A. Supertasters of PROP (6-n-propylthiouracil) rate the highest creaminess to high-fat milk products. *Chem Senses* 1996;21:598.
85. Gent JF, Bartoshuk LM. Sweetness of sucrose, neohesperidin dihydrochalcone, and saccharin is related to genetic ability to taste the bitter substance 6-n-propylthiouracil. *Chem Senses* 1983;7:265-72.
86. Hayes J, Duffy VB. Revisiting sucrose-fat mixtures: sweetness and creaminess vary with phenotypic markers of oral sensation. *Chem Senses* 2007;32:225-36.
87. Karrer T, Bartoshuk L. Capsaicin desensitization and recovery on the human tongue. *Physiol Behav* 1991;49:757-64.
88. Lim J. , Lenka Urban and Barry G. Green. Measures of Individual Differences in Taste and Creaminess Perception. *Chemical Senses* 2008;33(6):493-501.
89. Ly A, Drewnowski A. PROP (6-n-propylthiouracil) tasting and sensory responses to caffeine, sucrose, neohesperidin dihydrochalcone, and chocolate. *Chem Senses* 2001;26:41- 47.

90. Prescott J, Swain-Campbell N. Responses to repeated oral irritation by capsaicin, cinnamaldehyde and ethanol in PROP tasters and non-tasters. *Chem Senses* 2000;25:239-46.
91. Duffy VB, Lucchina LA, Bartoshuk LM. Genetic variation in taste: potential biomarker for cardiovascular disease risk? In Prescott J. Tepper BJ. (eds): *Genetic variation in taste sensitivity*. New York, Dekker 2004;195-228
92. Forrai G, Bankovi G. Taste perception for phenylthiocarbamide and food choice-a Hungarian twin study. *Acta Physiol Hung* 1984;64:33-40.
93. Keller KL, Steinmann L, Nurse RJ, Tepper BJ. Genetic taste sensitivity to 6-n-propylthiouracil influences food preference and reported food intake in preschool children. *Appetite* 2002;38:3-12.
94. Prescott, J., Bartoshuk, L. M., Prutkin, J. 6-n-Propylthiouracil tasting and the perception of nontaste oral sensations. In: Prescott, J Tepper, BJ eds. *Genetic Variation in Taste Sensitivity* 2004;89–104.
95. Kirkmeyer, S. V., Tepper, BJ. Understanding creaminess perception of dairy products using free-choice profiling and genetic responsivity to 6-n-propylthiouracil. *Chem Senses* 2003;28:527–536.
96. Kirkmeyer SV, Tepper BJ. Consumer reactions to creaminess in dairy products and genetic taste sensitivity to 6-n-propylthiouracil: A multidimensional study. *Food Quality & Preference*. 2005;16:545-556.
97. Nasser JA, Kissileff HR, Boozer CN, Chou CJ, Pi-Sunyer FX. PROP taster status and oral fatty acid perception. *Eat Behav*. 2001;2(3):237-45.
98. Goldstein GL, Daun H, Tepper BJ. Adiposity in middle-aged women is associated with genetic taste blindness to 6-n-propylthiouracil. *Obes Res* 2005;13:1017-23.



99. Tepper BJ. Does genetic taste sensitivity to PROP influence food preferences and body weight? *Appetite* 1999;32:422.
100. Tepper BJ, Ullrich NV. Influence of genetic taste sensitivity to 6-n-propylthiouracil (PROP), dietary restraint and disinhibition on body mass index in middle-age women. *Physiol Behav* 2002;75:305-12.
101. Drewnowski A, Henderson SA, Cockcroft JE. Genetic sensitivity to 6-n-propylthiouracil has no influence on dietary patterns, body mass indexes, or plasma lipid profiles of women. *J Am Diet Assoc.* 2007;107(8):1340–1348.
102. Kaminski LC, Henderson SA, Drewnowski A. Young women's food preferences and taste responsiveness to 6-n-propylthiouracil (PROP). *Physiol Behav* 2000;68:691-7.
103. Timpson NJ, Christensen M, Lawlor DA. TAS2R38 (phenylthiocarbamide) haplotypes, coronary heart disease traits, and eating behaviour in the British Women's Heart and Health Study. *Am J Clin Nutr* 2005;81:1005-11.
104. Yackinous CA, Guinard JX. Relation between PROP (6-n-propylthiouracil) taster status, taste anatomy and dietary intake measures for young men and women. *Appetite* 2002;38:201-9.
105. Stunkard A, Messick S. The three-factor eating questionnaire to measure dietary restraint, disinhibition, and hunger. *J Psychosom Res* 1985;29:71-83.
106. Laessle RG, Tuschl RJ, Kotthaus BC, Pirke KM. Behavioral and biological correlates of dietary restraint in normal life. *Appetite* 1989;12:83-94
107. Tepper BJ, Trail AC, Shaffer SE. Diet and physical activity in restrained eaters. *Appetite* 1996;27:51-64.
108. Alexander JM, Tepper BJ. Use of reduced-calorie/reduced-fat foods by young adults: influence of gender and restraint. *Appetite* 1995;25:217-30.

109. Westnhoeffer J, Dietary restraint and disinhibition: is restraint a homogeneous construct? *Appetite* 1991;16:45-55.
110. Lawson OJ, Williamson DA, Champagne CM, DeLany JP, Brooks ER, Howat PM, Wozniak PJ, Bray GA, Ryan DH. The association of body weight, dietary intake, and energy expenditure with dietary restraint and disinhibition. *Obes Res* 1995;3:153-61.
111. Henkin RI, Lippoldt RE, Bilstad J, Edelhoch H. A zinc protein isolated from human parotid saliva. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:488-92.
112. Fernley RT, Farthing J, Cooper EJ. Radioimmunoassay for salivary carbonic anhydrase in human parotid saliva. *Arch Oral Biol* 1995;40:567-9.
113. Parkkila S, Kaunisto K, Rajaniemi L, Kumpulainen T, Jokinen K, Rajaniemi H. Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase isoenzymes VI, II, and I in human parotid and submandibular glands. *J Histochem Cytochem* 1990;38:941-7.
114. Thatcher BJ, Doherty AE, Orvisky E, Martin BM, Henkin RI. Gustin from human parotid saliva is carbonic anhydrase VI. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;250:635-41.
115. Leinonen J, Parkkila S, Kaunisto K, Koivunen P, Rajaniemi H. Secretion of carbonic anhydrase isoenzyme VI (CA-VI) from human and rat lingual serous von Ebner's glands. *J Histochem Cytochem* 2001;49:657-62.
116. Henkin RI, Martin BM, Agarwal RP. Decreased parotid saliva gustin/carbonic anhydrase isoenzyme VI secretion: an enzyme disorder manifested by gustatory and olfactory dysfunction. *Am J Med Sci* 1999;318:380-91.

117. Henkin RI, Martin BM, Agarwal RP. Efficacy of exogenous oral zinc in treatment of patients with carbonic anhydrase VI deficiency. *Am J Med Sci* 1999;318:392–405.
118. Henkin RI, Law JS, Nelson NR. The role of zinc on the trophic growth factors nerve growth factor and gustin. In: Hurley LS, Keen CL, Lonnerdal B, Rucker RB, eds. *Trace elements in man and animal*. 1988;6:385-8.
119. Law JS, Nelson NR, Watanabe K, Henkin RI. Human salivary gustin is a potent activator of calmodulin-dependent brain phosphodiesterase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:1674–8.
120. Stewart-Knox BJ, Simpson EEA, Parr H, et al. Taste acuity in response to zinc supplementation in older European. *Br J Nutr* 2008;99:129-36.
121. Shatzman AR, Henkin RI. Gustin concentration changes relative to salivary zinc and taste in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:3867-71.
122. Peres RC, Camargo G, Mofatto LS, et al. Association of polymorphisms in the carbonic anhydrase 6 gene with salivary buffer capacity, dental plaque pH, and caries index in children aged 7-9 years. *Pharmacogenomics J* 2010;10:114-9.
123. Lawless H. A comparison of different methods used to assess sensitivity to the taste of phenylthiocarbamide (PTC). *Chem Senses* 1980;5:247-56.
124. Rankin KM, Godinot N, Christensen CM, Tepper BJ, Kirkmeyer SV. Assessment of different methods for 6-n-propylthiouracil status classification. In: Prescott J, Tepper BJ,

- editors. Genetic variation in taste sensitivity, New York: Marcel Dekker; 2004;63-88.
125. Di Lorenzo P, Monroe S. Taste responses in the parabrachial pons of ovariectomized rats. *Brain Res Bull* 1990;25:741-8.
  126. Green BG, Shaffer GS, Gilmore MM. Derivation and evaluation of a semantic scale of oral sensation magnitude with apparent ratio properties. *Chem Senses* 1993;18:683-702.
  127. Bartoshuk L. The psychophysics of taste. *Am J Clin Nutr* 1978;31:1068 - 1077.
  128. Sanguineti CJ, Dias Neto E, Simpson SJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 1994;17:914-21.
  129. Shahbake M, Hutchinson I, Laing DG, Jinks AL. Rapid quantitative assessment of fungiform papillae density in the human tongue. *Brain Res* 2005;1052:196-201.
  130. Miller IJ. Anatomy of the peripheral taste system. In: Doty RL, editor. *Handbook of olfaction and gustation*. New York: Marcel Dekker; 1995;521-547.
  131. Zhang GH, Zhang HY, Wang XF, Zhan YH, Deng SP and Qin YM. The Relationship between Fungiform Papillae Density and Detection Threshold for Sucrose in the Young Males. *Chem. Senses* 2009;34:93-99.
  132. Glanville EV, Kaplan AR. Taste perception and the menstrual cycle. *Nature*. 1965;205:930-931.

133. Green BG, Dalton P, Cowart B, Shaffer G, Rankin K, Higgins J (1996). Evaluating the 'Labeled Magnitude Scale' for measuring sensations of taste and smell. *Chem Senses* 21(3):323–334.
134. Kamphuis MM, Lejeune MP, Saris WH, Westerterp-Plantenga MS. 2003. The effect of conjugated linoleic acid supplementation after weight loss on body weight regain, body composition, and resting metabolic rate in overweight subjects. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 27:840–47
135. Rousset F. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resources* 2008;8:103-6.
136. McGuffin LJ, Bryson K, Jones DT. The PSIPRED protein structureprediction server. *Bioinformatics* 2000;16:404–5.
137. Linding R, Russel RB, Neduva V, Gibson TJ. GlobPlot: exploring protein sequences for globularity and disorder. *Nucleic Acids Res* 2003;31:3701–8.
138. Excoffier L, Laval LG, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 2005;1:47-50.
139. Shatzman AR, Henkin RI. Metal-binding characteristics of the parotid salivary protein gustin. *Biochim Biophys Acta* 1980;623:107–18.
140. Jiang W, Gupta D. Structure of carbonic anhydrase VI (CA6) gene: evidence of distinct groups within the  $\alpha$ -CA gene family. *Biochem J* 1999;344:385–90.
141. Doszta'nyi Z, Sa'ndor M, Tompa P, Simon I. Prediction of protein disorder at the domain level. *Curr Protein Pept Sci* 2007;8:161–71.

142. Nishimori I, Onishi S, Vullo D, Innocenti A, Scozzafava A, Supuran CT. Carbonic anhydrase activators: The first activation study of the human secretory isoform VI with amino acids and amines. *Bioorg Med Chem* 2007;15:5351–7.

I



# Sensitivity to 6-*n*-propylthiouracil is associated with gustin (carbonic anhydrase VI) gene polymorphism, salivary zinc, and body mass index in humans<sup>1–3</sup>

Alessandra Padiglia, Andrea Zonza, Elena Atzori, Caterina Chillotti, Carla Calò, Beverly J Tepper, and Iole Tomassini Barbarossa

## ABSTRACT

**Background:** The individual ability to taste 6-*n*-propylthiouracil (PROP) may be correlated with body mass index (BMI) and differences in the salivary proteins involved in taste function, such as the zinc-dependent enzyme gustin, which is a trophic factor of taste buds.

**Objective:** We investigated the possible association of PROP taste responsiveness with gustin gene polymorphism rs2274333 (A/G), salivary ionic zinc concentrations, and BMI.

**Design:** We measured cognitive eating behaviors and BMI in 75 volunteers (28 men and 47 women; mean  $\pm$  SEM age: 25  $\pm$  3 y). The intensity of taste perception evoked by PROP and sodium chloride solutions was estimated to evaluate PROP taster status. Salivary ionic zinc concentrations were measured, and molecular analyses of the gustin gene polymorphism were performed in individuals classified by PROP status by using polymerase chain reaction techniques.

**Results:** We classified subjects as PROP supertasters ( $n = 27$ ), medium tasters ( $n = 28$ ), or nontasters ( $n = 20$ ). Salivary ionic zinc concentrations and BMI were greater in nontasters than in supertasters ( $P = 0.003$  and  $P = 0.042$ , respectively). Molecular analyses of gustin DNA showed that allele A and genotype AA were significantly more frequent in supertasters, whereas allele G and genotype GG were significantly more frequent in nontasters ( $P < 0.001$ ).

**Conclusions:** These data showed that responsiveness to PROP is inversely related to BMI and salivary ionic zinc concentrations. The gustin gene dimorphism rs2274333 observed in supertaster and nontaster subjects may influence the protein conformation and, thereby, affect zinc ion binding. Our data showed a direct association between PROP sensitivity and a polymorphism in the gustin gene that is hypothesized to affect its function. This trial was registered at clinicaltrials.gov as UNICADBSITB-1. *Am J Clin Nutr* 2010;92:539–45.

## INTRODUCTION

Taste sensitivity varies greatly in individuals and can strongly influence food choice and satiety (1). The physiologic role of taste variability could be related to evolutionary adaptation to specific environments to recognize substances potentially dangerous or necessary for bodily function (2). The best-known example of this variability is the genetic ability to taste the bitter thiourea compounds, phenylthiocarbamide (PTC) and 6-*n*-propylthiouracil (PROP). These compounds contain a chemical

moiety thiocyanate, which is responsible for their bitter taste (3–5). Individuals can be defined as tasters and nontasters on the basis of their threshold acuity for PTC and PROP. When tested at higher (ie, suprathreshold) concentrations, tasters can be further divided into those who perceive extreme intensity (ie, supertasters) or moderate intensity (ie, medium tasters) from these compounds (6, 7). Supertasters have a high density of fungiform papillae, which suggests that they are anatomically distinct from medium tasters (7–9). The ability to taste PROP is a heritable trait (10), and the gene that expresses receptors that bind the thiocyanate group is known as *TAS2R38* which resides on chromosome 7 (11).

PROP tasters are also more responsive than nontasters to various oral stimuli, including other bitter-tasting compounds (6, 12–18), sweet substances (19), chemical irritants (20, 21), and fats (8, 22). Given the nutritional value of dietary lipids, the relation between PROP bitterness intensity and acceptance or perception of fats is of particular interest. Several studies reported that PROP nontasters had a lower ability to distinguish fat content in foods, showed a higher acceptance of dietary fat (22–26), and consumed more servings of discretionary fats per day than did tasters (24). These findings led to the hypothesis of an inverse correlation between PROP status and body mass index (BMI), which is supported by several studies (27–30). However, other reports show no associations between PROP taster status and these variables (31–35). This lack of consensus suggests that other factors contribute to feeding behavior, food perception, and preference in PROP taster groups. Given that the PROP phenotype may have broad implications for nutritional status, it

<sup>1</sup> From the Biochemistry and Molecular Biology Division, Department of Science Applied to Biosystems (AP and EA); the Section of General Physiology, Department of Experimental Biology (AZ and ITB); the Clinical Pharmacology Section, Department of Neurosciences (C Chillotti); and the Section of Anthropology, Department of Experimental Biology (C Calò), University of Cagliari, Monserrato, Italy; and the Department of Food Science, School of Environmental and Biological Sciences, Rutgers University, New Brunswick, NJ (BJT).

<sup>2</sup> Supported by the Italian Ministry of University and Research.

<sup>3</sup> Address correspondence to I Tomassini Barbarossa, Section of General Physiology, Department of Experimental Biology, SS 554, Km 4500, 09042 Monserrato, Cagliari, Italy. E-mail: tomassin@unica.it.

Received February 23, 2010. Accepted for publication June 20, 2010.

First published online July 14, 2010; doi: 10.3945/ajcn.2010.29418.



would be of great interest to characterize other factors that may contribute to differences in the genetic predisposition to taste thiourea compounds.

Salivary proteins are involved in gustatory function and could be correlated with taste differences. Among them, gustin [carbonic anhydrase VI (CA6)], a zinc metalloprotein secreted by the serous acinar cells of parotid, submandibular, and von Ebner glands in humans may play a crucial role (36–40). Decreased secretion of salivary gustin has been associated with reduced or distorted taste and smell function (41). Some authors suggested that gustin (CA6) is a trophic factor that promotes the growth and development of taste buds by acting on taste-bud stem cells (42). The enzymatic function of gustin (CA6) depends on the presence of zinc at its active site (43, 44). Zinc treatment can improve taste function in the elderly (45), increase gustin concentrations in individuals with hypogeusia (46), and normalize taste function and taste-bud morphology in patients with CA6 deficiency (42). Recent findings have shown that a genetic polymorphism of gustin (CA6) is involved in the modulation of its activity (47). Other polymorphisms in the coding sequence of the gustin (CA6) gene has been identified but not investigated for associations with taste function.

The purpose of this study was to examine associations between PROP status and the gustin gene polymorphism rs2274333 (A/G), salivary zinc ion concentration, and BMI. We hypothesized that PROP nontaster status is associated with the recessive and less functional form of the gustin (CA6) gene polymorphism rs2274333 (A/G), which leads to decreased taste function. To our knowledge, this demonstration would provide the first mechanistic explanation for why PROP nontasters are less responsive to a broad range of oral stimuli.

## SUBJECTS AND METHODS

### Subjects

Seventy-five nonsmoking volunteers (28 men and 47 women) were recruited at the local University. All subjects were white and were originally from Sardinia, Italy. The mean age of subjects was 25 y and ranged from 20 to 29 y. Thresholds for the 4 basic tastes were evaluated in all subjects to rule out any gustatory impairment. The volunteers showed no variation of body weight >5 kg over the previous 3 mo. Subjects were not following a prescribed diet or using medications that might interfere with taste perception, and none of the subjects had food allergies. Subjects were assessed for cognitive eating behaviors with the 3-factor eating questionnaire (48). The questionnaire estimates 3 aspects of cognitive eating behavior: dietary restraint (conscious control of eating), disinhibition (loss of control over eating), and perceived hunger. Subjects were verbally informed about the procedure and the aim of the study. Each subject reviewed and signed an informed consent form at the beginning of the protocol. The study was approved by the Ethical Committee of the University Hospital of Cagliari, Italy.

### PROP taster status

The classification of subjects for PROP bitter taste status was determined by their PROP and sodium chloride ratings with the 3-solution test (49, 50). The test consists of 3 suprathreshold

PROPs (0.032, 0.32, and 3.2 mmol/L; Sigma-Aldrich, Milan, Italy) and sodium chloride (0.01, 0.1, 1.0 mol/L; Sigma-Aldrich) solutions. Sodium chloride was used as a standard because taste intensity to sodium chloride does not change by PROP taster status (49). Solutions were prepared with spring water the day before each session and stored in the refrigerator until 1 h before testing.

### Determination of salivary zinc ion concentrations

To minimize possible zinc contamination, glassware and plasticware were soaked for 24 h in 4 mol/L HCl and thoroughly rinsed with metal-free water. Saliva samples were examined under a microscope for food and blood contamination, and contaminated samples were discarded. Saliva was centrifuged ( $1,700 \times g$ ) for 10 min (Eppendorf Centrifuge, model 5417C; Eppendorf, Hamburg, Germany) to obtain samples free of cellular debris. Supernatant fluid from the centrifuged samples was drawn off with a Pasteur pipette, transferred to a test tube, diluted 1:5 with deionized water free of zinc, and immediately analyzed. The salivary ionic zinc concentration was measured with a QuantiChrom zinc-assay kit (Gentaur, Brussels, Belgium) in which the color intensity was directly proportional to the ionic zinc concentration in the sample. The absorbance of each sample was measured at 425 nm, and the total ionic zinc concentration was expressed in micrograms per deciliter.

### Analysis of gustin (CA6) gene polymorphism rs2274333

Subjects were genotyped for polymorphism rs2274333 (A/G). We investigated this polymorphism because it may modulate taste function because of its location at exon 3 of the gustin (CA6) gene which encodes amino acids residues of the active zinc ion binding site. In fact, the binding of zinc to the protein strongly affects gustin taste function (43). This polymorphism consists of an exchange of amino acid serine for glycine at codon 90 (Gly90Ser). DNA extraction was performed with the Invitrogen Charge Switch Forensic DNA Purification kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. The concentration was estimated by measurements of optical density at 260 nm. Molecular analyses were performed by using polymerase chain reaction techniques followed by nucleotide sequencing. The primers were synthesized by Invitrogen (50 nmol scale, desalted) Europrim-Invitrogen, Cambridge, United Kingdom). A fragment of 253 bp of the CA6 gene exon 3 was amplified with the sense 5'TGA-CCCCCTCTGTGTTTCACCT3' and antisense 5'GTGACTATGG-GGTTCAAAGG3' primers. The reaction mixtures (25  $\mu$ L) contained 250 ng DNA, 10 pmol of each primer, 1.5 mmol/L  $MgCl_2$ , 100 mmol/L buffer-HCl at pH 8.3, 50 mmol/L KCl, 200  $\mu$ mol/L deoxynucleotide triphosphate mix, and 1.5 units of Hot Master Taq DNA polymerase (Eppendorf). Thermal cycles of amplification were carried out in a thermocycler (mod. Personal Eppendorf Mastercycler; Eppendorf). The amplification protocol consisted of an initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 54°C for 30 s, and an extension at 72°C for 30 s. A final extension was conducted at 72°C for 5 min. Amplified samples were analyzed on a 1% agarose gel and a 6% polyacrylamide gel and stained with ethidium bromide. Lambda  $\Phi$ X174 Hae digest DNA was used as relative molecular mass markers. Polymerase chain reaction products were sequenced with an ABI Prism automated

sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Nucleotide and deduced amino acid sequence analyses were performed with the OMIGA version 2.0 software (Oxford Molecular, Madison, WI). The translation of nucleotide sequences was performed with ExPASy translate routine software (ExPASy Proteomics Server; Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva, Switzerland; <http://ca.expasy.org/>).

### Experimental protocol

The volunteers were requested to abstain from eating, drinking, and using oral care products for  $\geq 8$  h before testing. Subjects had to be in the test room 15 min before the beginning of the session to adapt to the environmental conditions that were kept constant throughout the experimental session (23–24°C; 40–50% relative humidity). Weight (in kg) and height (in m) were recorded for each subject to calculate the BMI (in kg/m<sup>2</sup>). The degree of dietary restraint and disinhibition was determined by the 3-factor eating questionnaire (48). A total of 5 mL whole unstimulated mixed saliva were collected between 0900 and 1100 into acid-washed polypropylene test tubes. To collect whole saliva without any specific stimulation, the volunteers were requested not to swallow the saliva produced in the oral cavity for 5 min. The samples were stored at –80°C until molecular and spectrophotometric analyses were completed as described previously.

To classify subjects by their PROP taster status, each volunteer was tested twice on a separate day over a 1-mo period. The order of stimulus presentation was reversed in the 2 sessions. Sodium chloride and PROP solutions were presented in a counterbalanced order, and samples within each solution type were tasted in random order. A 10 mL volume was used. Each stimulus was followed by oral rinsing with spring water. The interstimulus interval was set at 60 s. In women, the tests were always carried out the sixth day of the menstrual cycle to avoid taste sensitivity changes because of the estrogen phase (51, 52). Intensity ratings for PROP or sodium chloride were collected by using the labeled magnitude scale (53). After tasting each sample, subjects placed a mark on the scale corresponding to his/her perception of the stimulus. This procedure generated suprathreshold taste intensity functions for the 2 compounds (30, 49).

### Statistical analyses

To assign each subject to a PROP taster category (nontaster, medium taster, and supertaster), the mean of the 2 replicates was calculated for each solution type, and the results were plotted. According to Tepper et al (49), the taste dose-response curve for PROP was compared with that of sodium chloride for each subject. If the sodium chloride ratings increased more rapidly across concentrations than did the PROP ratings, the subject was classified as a nontaster. If the PROP rating increased more rapidly than did the sodium chloride rating, the subject was classified as a supertaster. The PROP curve overlapped with the sodium chloride curve in medium tasters. Mean ( $\pm$ SEM) values were calculated for nontasters, medium tasters, and supertasters, and 3-factor analysis of variance (ANOVA) was used to compare PROP intensity ratings with sodium chloride intensity ratings across groups. The Tukey test was used for post hoc comparisons.

BMI differences among taster groups were evaluated by analysis of covariance (ANCOVA) in which the 3 factors of the Stunkard and Messick questionnaire (48) were considered as covariates. The effects of PROP taster status on saliva zinc ion concentrations were analyzed by one-factor ANOVA. Post hoc comparisons for BMI and zinc ion concentrations were conducted with the Tukey test. Statistical analyses were conducted with STATISTICA for WINDOWS software (version 6.0; StatSoft Inc, Tulsa, OK). Fisher's method (Genepop software version 4.0; <http://kimura.univ-montp2fr/~rousset/Genepop.htm>) (54) was used to test genotype distribution and allele frequencies of gustin (CA6) polymorphism rs2274333 (A/G) according to PROP status.  $P \leq 0.05$  was considered significant.

### Analysis of protein structure

The effect of the genetic polymorphism in exon 3 on the secondary structure of CA6 was analyzed with the PSIPRED secondary structure prediction software (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) (55). The effect of the polymorphism on the propensity to create unstructured/disordered segments within the CA6 protein sequence was analyzed with the GlobPlot software (<http://globplot.embl.de>); GlobPlot is a CGI (common-gateway interface)-based server for exploring potential globular and disordered regions within a protein of interest on the basis of its sequence (56).

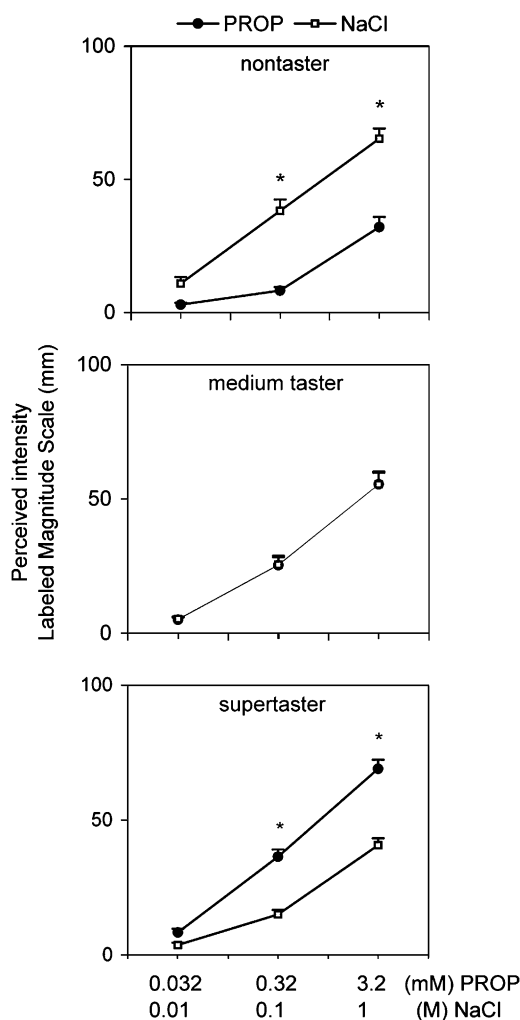
### RESULTS

Subjects were assigned to each taster group as follows: 27% of subjects were nontasters ( $n = 20$ ), 37% of subjects were medium tasters ( $n = 28$ ), and 36% of subjects were supertasters ( $n = 27$ ). ANOVA revealed a significant 3-way interaction of the taster group  $\times$  solution type  $\times$  concentration on the intensity ratings ( $F_{[4,432]} = 9.43$ ;  $P < 0.001$ ) (Figure 1). Post hoc comparisons showed that nontasters gave lower intensity ratings to the 2 highest concentrations of PROP compared with the 2 highest concentrations of sodium chloride, respectively ( $P < 0.001$  and  $P < 0.001$ ; Tukey test). Medium tasters gave similar ratings for PROP and sodium chloride at all concentrations. Supertasters gave higher ratings to 0.32 and 3.2 mmol/L PROP compared with the 2 highest concentrations of sodium chloride, respectively ( $P < 0.001$  and  $P < 0.001$ ; Tukey test).

The mean BMI ( $\pm$ SEM) was in the normal weight range for all 3 taster groups (Figure 2). With consideration of the 3 factors of the Stunkard and Messick questionnaire (48) as covariates, one-factor ANCOVA revealed that BMI varied with taster status ( $F_{[2,60]} = 3.19$ ;  $P < 0.048$ ). Post hoc comparisons showed that the BMI of nontasters was higher than that of supertasters ( $P = 0.042$ ; Tukey test). Scores relative to dietary restraint, disinhibition, and hunger were not different across subject groups ( $P > 0.05$ ; Tukey test).

Zinc ion concentrations in the saliva of supertasters, medium tasters, and nontasters are shown in Figure 3. One-factor ANOVA revealed that saliva zinc ion concentrations varied with taster status ( $F_{[2,72]} = 5.85$ ;  $P < 0.004$ ), and values were significantly higher in nontasters than in supertasters ( $P = 0.003$ ; Tukey test).

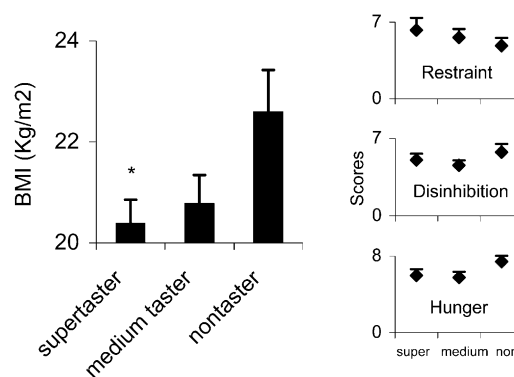
The gustin (CA6) gene polymorphism at rs2274333 (A/G) was associated with PROP status. In fact, the 3 taster groups differed



**FIGURE 1.** Mean ( $\pm$ SEM) values of the relation between perceived taste intensity and stimulus concentration in 6-*n*-propylthiouracil (PROP) nontasters ( $n = 20$ ), medium tasters ( $n = 28$ ), and supertasters ( $n = 27$ ). Three-factor ANOVA was used to compare PROP intensity ratings with sodium chloride (NaCl) intensity ratings across groups ( $P < 0.001$ ). \*Significant difference between PROP and the corresponding sodium chloride concentration,  $P < 0.001$  (Tukey test).

statistically on the basis of their genotype ( $\chi^2 = 26.642$ ;  $P = 1.64 \times 10^{-6}$ ; Fisher's test) and allelic frequencies ( $\chi^2 = 35.455$ ;  $P = 2 \times 10^{-8}$ ; Fisher's test) (Table 1). Pairwise comparisons also showed that all groups differed from each other ( $\chi^2 > 9.441$ ;  $P < 0.009$ ; Fisher's test). The genotype AA and allele A were more frequent in supertasters, whereas genotype GG and allele G were more frequent in nontasters (genotype  $\chi^2 = 26.455$ ;  $P < 0.001$ ; allele  $\chi^2 = 18.571$ ;  $P < 0.001$ ). Specifically, 92.6% of the supertasters carried the A allele, whereas the 65% of nontasters carried the G allele at this location. The presence of allele A was more frequent (67.9%) than allele G (32.1%) in medium tasters.

Analyses with the PSIPRED software (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) showed that polymorphism rs2274333 (A/G) had a local effect on the secondary structure of gustin (CA6) (Figure 4). The presence of the G allele in the nucleotide sequence determined the appearance of a  $\beta$ -strand in the secondary structure of the protein immediately downstream of Gly90 (Figure 4B) that was absent when the A allele produced the codon Ser (Figure 4A). In addition, the GlobPlot software



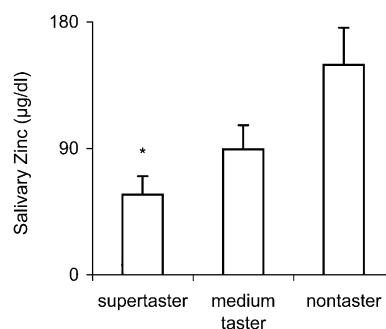
**FIGURE 2.** Mean ( $\pm$ SEM) values of BMI (in kg/m²) measured in supertasters (super;  $n = 27$ ), medium tasters (medium;  $n = 28$ ), and nontasters (non;  $n = 20$ ). One-factor ANCOVA was used to compare BMI differences across taster groups ( $P < 0.048$ ). The 3 factors of the Stunkard and Messick questionnaire (48) [ie, restraint, disinhibition, and hunger (shown to the right in the figure)] were considered covariates in the ANCOVA analysis. \*Significant difference with respect to the nontaster value,  $P = 0.042$  (Tukey test).

showed that the domain of 6 amino acids, from 83 to 87, appeared to have a disordered shape when Gly90 was present in the protein sequence, whereas Ser at the same position did not reveal any disordered region.

## DISCUSSION

The relation between PROP taster status and BMI has often been investigated but with contradictory results (27–35). This implies that other factors are crucial in determining the general relation between taste and feeding behavior, and a variation in BMI is only one possible consequence of reduced taste responsiveness. Subjects in the current study were not overweight. Nevertheless, our results support the inverse relation between PROP sensitivity and BMI, and confirm that cognitive factors may play a prominent role in the determination of this relation as shown previously (1, 30).

A primary aim of the current work was to characterize other factors that may contribute to differences in the genetic predisposition to taste thiourea compounds. For the first time to our knowledge, we showed that responsiveness to PROP was inversely related to salivary zinc ion concentrations and directly associated with polymorphism rs2274333 (A/G) in exon 3 of the



**FIGURE 3.** Mean ( $\pm$ SEM) values of saliva zinc ion concentration in supertasters ( $n = 27$ ), medium tasters ( $n = 28$ ), and nontasters ( $n = 20$ ). One-factor ANOVA was used to analyze the effects of 6-*n*-propylthiouracil taster status on saliva zinc ion concentrations ( $P < 0.004$ ). \*Significant difference with respect to nontaster value,  $P = 0.003$  (Tukey test).

Distribution of genotypes and allele frequencies of gustin (carbonic anhydrase VI) polymorphism rs2274333 (A/G) according to 6-*n*-propylthiouracil (PROP) taster status

PROP sensitivity							<i>P</i> <sup>1</sup>
Supertaster		Medium taster		Nontasters			
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
Genotype							
AA	23	85.19	14	50.00	5	25.00	1.64 × 10 <sup>-2</sup>
GG	0	0	4	14.29	11	55.00	
AG	4	14.81	10	35.71	4	20.00	
Allele							
A	50	92.59	38	67.86	14	35.00	2 × 10 <sup>-8</sup>
G	4	7.40	18	32.14	26	65.00	

gustin (CA6) gene that seems to be related with the capacity of the protein to bind zinc. It is known that gene polymorphisms are a mechanism by which individuals exhibit functional variation within the physiologic range (47). A comparative analysis of the rs2274333 polymorphism allowed us to associate the highest responsiveness to PROP (in supertasters) to genotype AA and allele A, the lowest responsiveness to PROP in nontasters to genotype GG and allele G, and moderate PROP responsiveness of medium tasters to the presence of at least one A allele.

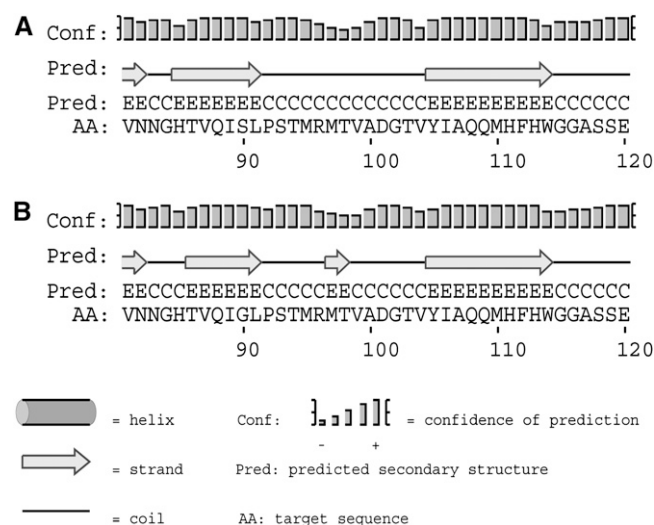
Our results suggest that the rs2274333 (A/G) polymorphism influences zinc binding to gustin (CA6). Gustin activity depends on the presence of zinc at the active site (43, 44). The full functional activity of gustin (CA6) has been established to be crucial for taste function (41, 42, 45, 46). It has been suggested that the tightly bound zinc is complexed to the enzyme via 3 histidine residues (57). Two of these histidine residues are encoded by codons 111 and 113 of exon 3, whereas the third residue is encoded by codon 138 of exon 4 of the gustin (CA6) gene (58). The presence of a  $\beta$ -strand immediately downstream of Gly90 in the protein secondary structure and of a disordered region from amino acid residues 83–87 immediately upstream of

the same Gly led us to suggest that a structural modification of the protein active site may occur, which could render the binding with zinc ions less stable. In fact, it has been reported that intrinsically disordered or unstructured proteins exist in a highly flexible conformational state and are largely devoid of secondary structural elements and tertiary contacts (59). Because exon 3 codes for various amino acids residues of the active site, including 2 out of 3 histidines involved in zinc ion binding (58, 60), we hypothesized that the Ser residue at position 90 in the primary structure, as observed in supertasters, could provide optimal geometry of the active site for zinc binding. On the contrary, the presence of the Gly residue that was observed in nontasters could reduce the binding of zinc ions to the active site and affect its enzymatic activity. Therefore, the high concentration of zinc ions in nontaster saliva may be related to the geometry of the domain derived from the protein translation of exon 3, which does not allow the binding of zinc ions to histidine 111 and 113. This hypothesis may explain the contradictory response to zinc treatment in patients with impaired taste ability reported by Henkin et al (42). In fact, those patients resistant to zinc treatment may have the GG genotype and, therefore, may not be able to bind zinc and improve gustin activity.

We also showed that a few of the nontasters carried the AA genotype. The low sensitivity in these individuals may be explained by a quantitatively lower expression of gustin protein or by a decrease in other saliva constituents that, as transporters of hydrophobic molecules, can interact and vehicle taste stimuli to receptor sites. Further studies are in progress to verify this hypothesis.

It is known that PROP nontaster status is associated with reduced fungiform papillae density (7–9), and authors (42) have suggested that gustin (CA6) is a trophic factor for taste bud development. Therefore, we suggested that the association between mutations in gustin (CA6) and nontaster status might provide an explanation for reduced papillae densities in this group as well as the general reduction in oral chemosensory abilities that have been reported in these individuals. This hypothesis deserves further investigation because it provides a mechanistic link between PROP taster status, the perception and preference for foods (including dietary fats), and differences in BMI, which we reported here and in previous studies (6, 8, 12–30).

In conclusion, these novel findings suggest that gustin polymorphism rs2274333 contributes to a variation in taste ability that



**FIGURE 4.** PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) (55) prediction of protein secondary structure of the carbonic anhydrase VI region that includes polymorphism rs2274333 (amino acid 90). A: Ser90 polymorphism. B: Gly90 polymorphism.



could affect differences in food perception and preference across PROP taster groups. Furthermore, our study indicates that genotyping of the gustin (CA6) gene may represent a reliable and specific marker for individual differences in taste perception and may find application as an investigation tool in studies that aim to evaluate eating behavior and taste function impairment.

We thank the volunteers whose contributions made this study possible. We also thank Sebastiano Banni (University of Cagliari, Cagliari, Italy) for critically reviewing the manuscript, Francesca Manchinu (CNR Neurogenetics and Neuropharmacology Institute, Cagliari, Italy), and Valentina Urpi (Kriagen Molecular Biology Center, Cagliari, Italy) for sequencing the polymerase chain reaction products.

The authors' responsibilities were as follows—AP and ITB: experimental design, data analyses and interpretation, and writing of the manuscript; AZ, EA, and C Chillotti: data collection and supervision of the clinical trial and laboratory analyses; C Calò: contribution to the molecular and data analyses; and BJT: contribution to the critical discussion of the data, revision and edit of the final version of the manuscript. None of the authors had a conflict of interest.

## REFERENCES

1. Tepper BJ. Nutritional implications of genetic taste variation: the role of PROP sensitivity and other taste phenotypes. *Annu Rev Nutr* 2008;28:367–88.
2. Soranzo N, Bufo PC, Sabeti JF, et al. Positive selection on a high-sensitivity allele of the human bitter taste receptor TAS2R16. *Curr Biol* 2005;15:1257–65.
3. Fox AL. The relationship between chemical constitution and taste. *Proc Natl Acad Sci USA* 1932;18:115–20.
4. Harris H, Kalmus H. Chemical sensitivity in genetical differences of taste sensitivity. *Ann Eugen* 1949;15:32–45.
5. Guo SW, Reed DR. The genetics of phenylthiocarbamide perception. *Ann Hum Biol* 2001;28:111–42.
6. Bartoshuk LM. The biological basis of food perception and acceptance. *Food Qual Pref* 1993;4:21–32.
7. Bartoshuk LM, Duffy VB, Miller JJ. PTC/PROP tasting: anatomy, psychophysics, and sex effects. *Physiol Behav* 1994;56:1165–71.
8. Tepper BJ, Nurse RJ. Fat perception is related to PROP taster status. *Physiol Behav* 1997;61:949–54.
9. Essick GK, Chopra A, Guest S, McGlone F. Lingual tactile acuity, taste perception, and the density and diameter of fungiform papillae in female subjects. *Physiol Behav* 2003;80:289–302.
10. Kalmus H. Improvements in the classification of the tasters genotypes. *Ann Hum Genet* 1958;22:222–30.
11. Kim UK, Jorgenson E, Coon H, Leppert M, Risch N, Drayna D. Positional cloning of the human quantitative trait locus underlying taste sensitivity to phenylthiocarbamide. *Science* 2003;299:1221–5.
12. Bartoshuk LM. Bitter taste of saccharin: related to the genetic ability to taste the bitter substance 6-n-propylthiouracil (PROP). *Science* 1979;205:934–5.
13. Bartoshuk LM, Rifkin B, Marks LE, Bars P. Taste and aging. *J Gerontol* 1986;41:51–7.
14. Bartoshuk LM, Rifkin B, Marks LE, Hooper JE. Bitterness of KCl and benzoate: related to genetic status for sensitivity to PTC/PROP. *Chem Senses* 1988;13:517–28.
15. Bartoshuk LM, Fast K, Karre TA, Marino S, Price RA, Reed DA. PROP supertasters and the perception of sweetness and bitterness. *Chem Senses* 1992;17:594.
16. Bartoshuk LM, Duffy VB, Lucchina LA, Prutkin JM, Fast K. PROP (6-n-propylthiouracil) supertasters and the saltiness of NaCl. *Ann N Y Acad Sci* 1998;855:793–6.
17. Gent JF, Bartoshuk LM. Sweetness of sucrose, neohesperidin dihydrochalcone, and saccharin is related to genetic ability to taste the bitter substance 6-n-propylthiouracil. *Chem Senses* 1983;7:265–72.
18. Ly A, Drewnowski A. PROP (6-n-propylthiouracil) tasting and sensory responses to caffeine, sucrose, neohesperidin dihydrochalcone, and chocolate. *Chem Senses* 2001;26:41–7.
19. Yeomans MR, Tepper BJ, Rietzschel J, Prescott J. Human hedonic responses to sweetness: role of taste genetics and anatomy. *Physiol Behav* 2007;91:264–73.
20. Duffy VB, Davidson AC, Kidd JR, et al. Bitter receptor gene (TAS2R38), 6-n-propylthiouracil (PROP) bitterness and alcohol intake. *Alcohol Clin Exp Res* 2004;28:1629–37.
21. Prescott J, Swain-Campbell N. Responses to repeated oral irritation by capsaicin, cinnamaldehyde and ethanol in PROP tasters and non-tasters. *Chem Senses* 2000;25:239–46.
22. Hayes JE, Duffy VB. Revisiting sucrose-fat mixtures: sweetness and creaminess vary with phenotypic markers of oral sensation. *Chem Senses* 2007;32:225–36.
23. Tepper BJ, Nurse RJ. PROP taster status is related to the perception and preference for fat. *Ann N Y Acad Sci* 1998;855:802–4.
24. Keller KL, Steinmann L, Nurse RJ, Tepper BJ. Genetic taste sensitivity to 6-n-propylthiouracil influences food preference and reported food intake in preschool children. *Appetite* 2002;38:3–12.
25. Duffy VB, Bartoshuk LM. Food acceptance and genetic variation in taste. *J Am Diet Assoc* 2000;100:647–55.
26. Forrai G, Bankovi G. Taste perception for phenylthiocarbamide and food choice—a Hungarian twin study. *Acta Physiol Hung* 1984;64:33–40.
27. Goldstein GL, Daun H, Tepper BJ. Adiposity in middle-aged women is associated with genetic taste blindness to 6-n-propylthiouracil. *Obes Res* 2005;13:1017–23.
28. Tepper BJ, Koelliker Y, Zhao L. Variation in the bitter-taste receptor gene TAS2R38, and adiposity in a genetically isolated population in Southern Italy. *Obesity (Silver Spring)* 2008;16:2289–95.
29. Tepper BJ. Does genetic taste sensitivity to PROP influence food preferences and body weight? *Appetite* 1999;32:422.
30. Tepper BJ, Ullrich NV. Influence of genetic taste sensitivity to 6-n-propylthiouracil (PROP), dietary restraint and disinhibition on body mass index in middle-age women. *Physiol Behav* 2002;75:305–12.
31. Drewnowski A, Henderson SA, Cockcroft JE. Genetic sensitivity to 6-n-propylthiouracil has no influence on dietary patterns, body mass indexes, or plasma lipid profiles of women. *J Am Diet Assoc* 2007;107:1340–8.
32. Yackinous C, Guinard JX. Relation between PROP taster status and fat perception, touch, and olfaction. *Physiol Behav* 2001;72:427–37.
33. Kaminski LC, Henderson SA, Drewnowski A. Young women's food preferences and taste responsiveness to 6-n-propylthiouracil (PROP). *Physiol Behav* 2000;68:691–7.
34. Timpson NJ, Christensen M, Lawlor DA. TAS2R38 (phenylthiocarbamide) haplotypes, coronary heart disease traits, and eating behaviour in the British Women's Heart and Health Study. *Am J Clin Nutr* 2005;81:1005–11.
35. Yackinous CA, Guinard JX. Relation between PROP (6-n-propylthiouracil) taster status, taste anatomy and dietary intake measures for young men and women. *Appetite* 2002;38:201–9.
36. Henkin RI, Lippoldt RE, Bilstad J, Edelhoch H. A zinc protein isolated from human parotid saliva. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:488–92.
37. Fernley RT, Farthing J, Cooper EJ. Radioimmunoassay for salivary carbonic anhydrase in human parotid saliva. *Arch Oral Biol* 1995;40:567–9.
38. Parkkila S, Kaunisto K, Rajaniemi L, Kumpulainen T, Jokinen K, Rajaniemi H. Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase isoenzymes VI, II, and I in human parotid and submandibular glands. *J Histochem Cytochem* 1990;38:941–7.
39. Thatcher BJ, Doherty AE, Orvisky E, Martin BM, Henkin RI. Gustin from human parotid saliva is carbonic anhydrase VI. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;250:635–41.
40. Leinonen J, Parkkila S, Kaunisto K, Koivunen P, Rajaniemi H. Secretion of carbonic anhydrase isoenzyme VI (CA-VI) from human and rat lingual serous von Ebner's glands. *J Histochem Cytochem* 2001;49:657–62.
41. Henkin RI, Martin BM, Agarwal RP. Decreased parotid saliva gustin/carbonic anhydrase isoenzyme VI secretion: an enzyme disorder manifested by gustatory and olfactory dysfunction. *Am J Med Sci* 1999;318:380–91.
42. Henkin RI, Martin BM, Agarwal RP. Efficacy of exogenous oral zinc in treatment of patients with carbonic anhydrase VI deficiency. *Am J Med Sci* 1999;318:392–405.
43. Henkin RI, Law JS, Nelson NR. The role of zinc on the trophic growth factors nerve growth factor and gustin. In: Hurley LS, Keen CL, Lonnerdal B, Rucker RB, eds. *Trace elements in man and animal*. Vol 6. New York, NY: Plenum Press, 1988:385–8.
44. Law JS, Nelson NR, Watanabe K, Henkin RI. Human salivary gustin is a potent activator of calmodulin-dependent brain phosphodiesterase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:1674–8.

45. Stewart-Knox BJ, Simpson EEA, Parr H, et al. Taste acuity in response to zinc supplementation in older European. *Br J Nutr* 2008;99:129–36.
46. Shatzman AR, Henkin RI. Gustin concentration changes relative to salivary zinc and taste in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:3867–71.
47. Peres RC, Camargo G, Mofatto LS, et al. Association of polymorphisms in the carbonic anhydrase 6 gene with salivary buffer capacity, dental plaque pH, and caries index in children aged 7-9 years. *Pharmacogenomics J* 2010;10:114–9.
48. Stunkard AJ, Messick S. The three-factor eating questionnaire to measure dietary restraint, disinhibition, and hunger. *J Psychosom Res* 1985; 29:71–83.
49. Tepper BJ, Cao J, Christensen CM. Development of brief methods to classify individuals by PROP taster status. *Physiol Behav* 2001;73:571–7.
50. Rankin KM, Godinot N, Christensen CM, Tepper BJ, Kirkmeyer SV. Assessment of different methods for 6-n-propylthiouracil status classification. In: Prescott J, Tepper BJ, eds. *Genetic variation in taste sensitivity*. New York, NY: Marcel Dekker, 2004:63–88.
51. Di Lorenzo PM, Monroe S. Taste responses in the parabrachial pons of ovariectomized rats. *Brain Res Bull* 1990;25:741–8.
52. Curtis KS, Stratford JM, Contreras RJ. Estrogen increases the taste threshold for sucrose in rats. *Physiol Behav* 2005;86:281–6.
53. Green BG, Shaffer GS, Gilmore MM. Derivation and evaluation of a semantic scale of oral sensation magnitude with apparent ratio properties. *Chem Senses* 1993;18:683–702.
54. Rousset F. Genepop'007: a complete reimplement of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resources* 2008;8:103–6.
55. McGuffin LJ, Bryson K, Jones DT. The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* 2000;16:404–5.
56. Linding R, Russel RB, Neduva V, Gibson TJ. GlobPlot: exploring protein sequences for globularity and disorder. *Nucleic Acids Res* 2003; 31:3701–8.
57. Shatzman AR, Henkin RI. Metal-binding characteristics of the parotid salivary protein gustin. *Biochim Biophys Acta* 1980;623:107–18.
58. Jiang W, Gupta D. Structure of carbonic anhydrase VI (CA6) gene: evidence of distinct groups within the  $\alpha$ -CA gene family. *Biochem J* 1999;344:385–90.
59. Dosztányi Z, Sándor M, Tompa P, Simon I. Prediction of protein disorder at the domain level. *Curr Protein Pept Sci* 2007;8:161–71.
60. Nishimori I, Onishi S, Vullo D, Innocenti A, Scozzafava A, Supuran CT. Carbonic anhydrase activators: The first activation study of the human secretory isoform VI with amino acids and amines. *Bioorg Med Chem* 2007;15:5351–7.

II



## Polymorphisms in *TAS2R38* and the taste bud trophic factor, gustin gene co-operate in modulating PROP taste phenotype

Carla Calò <sup>a,1</sup>, Alessandra Padiglia <sup>b,1</sup>, Andrea Zonza <sup>c</sup>, Laura Corrias <sup>a</sup>, Paolo Contu <sup>d</sup>, Beverly J. Tepper <sup>e</sup>, Iole Tomassini Barbarossa <sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Experimental Biology, Section of Anthropology, Monserrato, CA, I 09042, Italy

<sup>b</sup> Department of Life and Environment Sciences, University of Cagliari, Monserrato, CA, I 09042, Italy

<sup>c</sup> Department of Experimental Biology, Section of General Physiology, University of Cagliari, Monserrato, CA, I 09042, Italy

<sup>d</sup> Department of Public Health, University of Cagliari, Monserrato, CA, I 09042, Italy

<sup>e</sup> Department of Food Science, School of Environmental and Biological Sciences, Rutgers University, New Brunswick, NJ 08901-8520, USA

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 11 May 2011

Received in revised form 13 June 2011

Accepted 14 June 2011

#### Keywords:

PROP taste

*TAS2R38*

Gustin (CA6) gene

### ABSTRACT

The PROP taste phenotype varies greatly among individuals, influencing eating behavior and therefore may play a role in body composition. This variation is associated with polymorphisms in the bitter receptor gene *TAS2R38* and the taste-bud trophic factor gustin gene. The aim of this study was to examine the relationship between *TAS2R38* haplotypes and the gustin gene polymorphism rs2274333 in modulating PROP taste phenotype. PROP phenotype was determined in seventy-six volunteers (29 males, 47 females, age  $25 \pm 3$  y) by scaling methods and threshold measurements. *TAS2R38* and gustin gene genotyping was performed using PCR techniques. The lowest responsiveness in PROP nontasters is strongly associated with the AVI nontasting *TAS2R38* variant and the highest responsiveness in supertasters is strongly associated to allele A and genotype AA of the gustin gene. These data support the hypothesis that the greater sensitivity of supertasters could be mediated by a greater taste-bud density. Polymorphisms in *TAS2R38* and gustin gene, together, accounted for up to 60% of the phenotypic variance in PROP bitterness and to 40% in threshold values. These data suggest that other unidentified factors may be more relevant for detecting low concentrations of PROP. Moreover, the presence of the PAV variant receptor may be important for detecting high concentrations of PROP, whereas the presence of allele A in gustin polymorphism may be relevant for perceiving low concentrations. These data show how the combination of the *TAS2R38* and gustin gene genotypes modulate PROP phenotype, providing an additional tool for the evaluation of human eating behavior and nutritional status.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

The ability to taste the bitter thiourea compounds, phenylthiocarbamide (PTC) and 6-n-propylthiouracil (PROP) varies greatly among individuals and is a well-studied human trait [1]. Thiourea compounds contain the thiocyanate moiety ( $\text{N}=\text{C}=\text{S}$ ) which is responsible of their bitter taste [2,3]. The  $\text{N}=\text{C}=\text{S}$  grouping is also characteristic of glucosinolates and goitrin, naturally-occurring substances commonly found in cruciferous vegetables and other plants of the *Brassica* family [4]. Goitrin has potent anti-thyroid properties, and can be toxic when consumed in large quantities by populations at-risk for thyroid deficiency [5]. One intriguing explanation for the persistence of this trait in humans is that it served as an evolutionary adaptation to local

eating environments [6]. Greater rejection of *Brassica* plants would provide survival advantages to those who were more sensitive to their bitter taste [7]. Contemporary studies in human nutrition have also revealed that PROP bitterness might also serve as a general marker for oral sensations and food preferences. This assumption is based on data showing that those who perceive PROP/PTC as more bitter also perceive greater sweetness, oral pungency and rich-creamy texture from foods, and they typically show lower acceptance and selection of strong-tasting versions of these foods [8–13]. Thus, PROP responsiveness could have broad implications for human health and nutrition [14,15], although not all studies support this conclusion [16].

Based on threshold methods, PROP sensitive and non sensitive individuals are defined as tasters and nontasters, respectively. The frequency of nontasters varies among populations, from as low as 7% to more than 40% [17]. In the Caucasian population, the estimated frequency of nontasters is ~30% [6,18–20]. Bartoshuk [21,22] first used the term “supertaster” to distinguish individuals who perceived PROP as extremely bitter from those who perceived PROP as moderately bitter. Although numerous studies support the classification of individuals into

\* Corresponding author at: Department of Experimental Biology, Section of General Physiology, S.S. 554, Km 4.500, 09042 Monserrato, CA, Italy. Tel.: +39 0706754144; fax: +39 0706754191.

E-mail address: [tomassin@unica.it](mailto:tomassin@unica.it) (I.T. Barbarossa).

<sup>1</sup> Contributed equally to this work.



three phenotypic groups (nontasters, medium tasters and supertasters) [9,12,19,23–29], other work suggests that PROP tasting may be a more continuous phenotype [9,24–26,30]. Nevertheless, studies have consistently reported that supertasters have a higher density of fungiform papillae on the anterior tongue surface when compared to the other groups [11,22,31,32]. These anatomical differences could partially explain the greater oral responsiveness of supertasters to a range of oral sensations that are not mediated via bitter taste receptors.

The ability to taste PROP is associated with haplotypes of the *TAS2R38* gene defined by three single-nucleotide polymorphisms that result in three amino acid substitutions (Pro49Ala, Ala262Val, and Val296Ile) [25,30]. There are two common haplotypes, PAV the dominant (sensitive) variant and AVI the recessive (insensitive) one. Nontasters are homozygous for the AVI haplotype, and it was assumed that supertasters were homozygous for the PAV haplotype and medium tasters were heterozygous for the PAV haplotype. However, studies have reported considerable genotypic overlap between the medium and supertaster groups [19,25,30] with substantial numbers of supertasters carrying the PAV/AVI diplotype. Other work suggests that the presence of two PAV alleles (as opposed to one) confers no additional advantage for perceiving more bitterness intensity from PROP, at least in the suprathreshold (above threshold) range [26]. Thus, *TAS2R38* genotypes do not completely explain the oro-sensory differences between medium and supertasters. In fact, *TAS2R38* genotype predicts the majority (55–85%) but not all of the phenotypic variance in PROP threshold, implying that epigenetic factors may be involved in the expression of the trait [14,20,26,33]. Indeed, evidence supporting the presence of modifying genes comes from studies using a variety of approaches (family segregation, family-based linkage and genome-wide association studies [34–36]).

Our laboratory has been studying the role of the gustin (CA6) gene, a trophic factor for taste bud development, in PROP tasting [37]. We showed that polymorphism rs2274333 (A/G) of the gustin gene led to a modification gustin's primary structure which is crucial for zinc binding and full functionality of the protein [37]. The AA genotype (associated with a fully-functional protein) was more frequent in supertasters, whereas the GG genotype (associated with a disruption in the protein) was more frequent in nontasters. These data suggest that variation in gustin may be associated with differences in papillae densities and oral chemosensory abilities across PROP phenotypic groups.

The purpose of this work was to study how the combinations of *TAS2R38* and gustin gene genotypes modulate the PROP taste phenotype in an ethnically homogeneous cohort. In this work, PROP taste phenotype was assessed by threshold and suprathreshold measures to address detection and responsiveness at higher concentrations [14,22,26,28,37–39]. The two methods measure different features of the taste system which could be important for understanding gene–taste relationships [26].

## 2. Materials and methods

### 2.1. Subjects

Seventy-six non-smoking Caucasian subjects from Sardinia, Italy (29 men and 47 women) were recruited through poster advertisements at the local University. Mean age of the subjects was of 25 years (range 21 to 28 y) and all had a normal body mass index (BMI) ranging from 18.6 to 25.3 kg/m<sup>2</sup>. The subjects showed no variation of body weight larger than 5 kg over the previous 3 months. They were not following a prescribed diet or taking medications that might interfere with taste perception and none had food allergies. Subjects with extreme restraint and/or disinhibition scores [40] assessed by the Stunkard and Messick [41] Three-Factor Eating Questionnaire were excluded from participation. In order to rule out any gustatory impairments, thresholds for the 4 basic tastes (sweet, sour, salty,

bitter) were evaluated in all subjects. All were verbally informed about the procedure and the aim of the study. Each subject reviewed and signed an informed consent form at the beginning of the protocol. The study was approved by the Ethical Committee of the University Hospital of Cagliari, and has therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki.

### 2.2. PROP phenotype assessments

PROP phenotype of each subject was assessed by a scaling method for taster status classification and by detection threshold measurement. Classification of subjects by taster status was determined by their PROP and NaCl ratings using the 3-solution test [28,42]. The test consists of three suprathreshold PROP (0.032, 0.32, and 3.2 mmol/l) and NaCl (0.01, 0.1, 1.0 mol/l) solutions dissolved in spring water. NaCl was used as a standard because taste intensity to NaCl does not change by PROP taster status in this method [28]. PROP thresholds were determined using a variation of the ascending-concentration, 3-alternative forced-choice (3-AFC) procedure [43–45]. For the threshold test, the solutions ranged from 0.00001 to 32 mM in quarter-log steps. Reagent grade PROP (Sigma-Aldrich, Milan, Italy) was dissolved in spring water.

For both methods, the solutions were prepared the day before each session and stored in the refrigerator until 1 h before testing. The stimuli were presented at room temperature as 10 ml samples.

### 2.3. Molecular analysis

Subjects were genotyped for three single nucleotide polymorphisms (SNPs) at base pairs 145 (C/G), 785 (C/T), and 886 (G/A) of the *TAS2R38* locus, and for polymorphism rs2274333 (A/G) of the gustin (CA6) gene locus. The *TAS2R38* SNPs give rise to 3 non-synonymous coding exchanges: proline to alanine at residue 49; alanine to valine at residue 262; and valine to isoleucine at residue 296. These substitutions result in two major haplotypes (PAV and AVI) and three rare (AAI, PVI and AAV) that have been known in human populations. The polymorphism rs2274333 (A/G) consists of a substitution of amino acid Ser90Gly. The DNA was extracted from saliva samples using the Invitrogen Charge Switch Forensic DNA Purification kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Purified DNA concentration was estimated by measurements of OD260. PCR techniques were employed to amplify the two short region of the *TAS2R38* gene including the three polymorphisms, and the gustin gene region including rs2274333 polymorphism. The primers used were synthesized by Invitrogen (Europrim, Invitrogen Cambridge, UK). To determine *TAS2R38* haplotypes, PCR amplification followed by restriction analysis using *HaeIII* for SNP detection at 145 nucleotide position, and direct sequencing for SNPs identification at 785 and 886 nucleotide positions. The following primer set was used to amplify a fragment of 221 bp including the first of three SNPs: 5'-CCTTCGTTTCTTGTTGAATTTTGGGATGTAGTGAAGAGGCGG-3' (sense Primer) 5'-AGGTTGCTTGGTTTGAATCATC-3' (antisense Primer). The forward primer binds within the *TAS2R38* gene, from nucleotides 101 to 144. There is a single mismatch at position 143, where the primer has a G (underlined in bold) and the gene has an A. This mismatch is crucial to the PCR experiment, because the A nucleotide in the *TAS2R38* gene sequence, is replaced by a G in each of the amplified products. This creates the first G of the *HaeIII* recognition sequence GGCC, allowing the amplified taster allele to be cut. The amplified nontaster allele reads GGGC and is not cut. The PCR reaction mixtures (25 µL) contained 250 ng DNA, 10 pmol of each primer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris–HCl at pH 8.3, 50 mM KCl, 200 µM of dNTP mix, and 1.5 units of Hot Master Taq Eppendorf. Thermal cycles of amplification were carried out in a Personal Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Germany). The amplification

protocol consisted of initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 64 °C for 45 s, and then extension at 72 °C for 45 s. For the analysis of the polymorphism G/C at position 143, a 3 µl aliquot of PCR products was mixed with a 17 µl solution containing 2 µl 10×NE Buffer (50 mM NaCl, 10 mM Tris–HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dithiothreitol, pH 7.9), 0.2 µl HaeIII (10,000 U ml<sup>−1</sup>) (Sigma–Aldrich, St Louis, MO), and 14.8 µl sterile deionized H<sub>2</sub>O. The solution was incubated at 37 °C for 4 h. The digest was mixed with 5 ml of loading buffer and electrophoresed on a 10% vertical polyacrylamide gel. The DNA bands were evidenced by silver staining [46]. The PCR 100 bp Low Ladder DNA was used as Mr markers (Sigma–Aldrich). Polymorphisms at the 785 and 886 nucleotide positions were identified by a single PCR reaction using the sense primer 5′-TCGTGACCCAGCCTGGAGG-3′ and the antisense primer 5′-GCACAGTGTCGGGAATCTGCC-3′ delimiting a 298 bp fragment. The PCR reaction mixtures (25 µL) contained 250 ng DNA, 10 pmol of each primer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris–HCl at pH 8.3, 50 mM KCl, 200 µM of dNTP mix, and 1.5 units of Hot Master Taq Eppendorf. Thermal cycles of amplification were carried out in a Personal Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Germany). The amplification protocol consisted of initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 30 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 60 °C for 30 s, and then extension at 72 °C for 30 s. Amplified samples were analyzed on a 1% agarose gel and on 6% polyacrylamide gel and stained with ethidium bromide. The PCR 100 bp Low Ladder DNA was used as Mr markers.

To genotype gustin gene polymorphism rs2274333, a fragment of 253 bp was amplified with the forward 5′TGACCCCTCTGTGTTCACT3′ and reverse 5′GTGACTATGGGGTTCAAAGG3′ primers. The reaction mixtures (25 µL) contained 250 ng DNA, 10 pmol of each primer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris–HCl at pH 8.3, 50 mM KCl, 200 µM of dNTP mix, and 1.5 units of Hot Master Taq Eppendorf. Thermal cycles of amplification were carried out in a Personal Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Germany). The amplification protocol included an initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 54 °C for 30 s, and then extension at 72 °C for 30 s. A final extension was carried out at 72 °C for 5 min. Amplified samples were analyzed on a 1% agarose gel and on a 6% polyacrylamide gel and stained with ethidium bromide. The pUC18 HaeIII digest phage DNA was used as Mr markers (Sigma–Aldrich). PCR products were sequenced with an ABI Prism automated sequencer. Nucleotide and deduced amino acid sequence analyses were performed with the OMIGA version 2.0 software (Oxford Molecular, Madison, WI).

#### 2.4. Experimental procedure

Subject testing was carried out in three visits on different days separated by a 1-month period. In women, the taste assessments were carried out around the sixth day of the menstrual cycle to avoid taste sensitivity changes due to the estrogen phase [47]. Subjects were requested to abstain from eating, drinking and using oral care products or chewing gums for at least 8 h prior to testing. They had to be in the test room 15 min before the beginning of the session (9.00 AM for the 1st visit and 10 AM for the 2nd and 3rd ones) in order to adapt to the environmental conditions (23–24 °C; 40–50% relative humidity) which were kept constant throughout the experimental session. In the first visit, a 5 ml sample of whole-mouth unstimulated mixed saliva was collected from each subject into an acid-washed polypropylene test tube by means a soft plastic aspirator as it flowed into the anterior floor of the mouth. The samples were stored at −80 °C until molecular analyses were completed as described above.

One hour after saliva sample collection, each subject was classified for PROP bitter taste status. Each subject was tested twice in the first visit and in the second one. The order of taste stimulus presentation

was reversed in the two sessions. NaCl and PROP solutions were presented in a counterbalanced order, and samples within each solution type were tasted at random. Each stimulation was followed by oral rinsing with spring water. The interstimulus interval was set at 60 s. Taste intensity rating for each PROP or NaCl solution was collected using the Labeled Magnitude Scale (LMS) [48]. The scale is anchored at the top with the label descriptor “strongest imaginable”. The scale gives subjects the freedom to rate the intensity of a stimulus relative to the “strongest imaginable” taste or any oral stimulus they have ever experienced in their life. After tasting each sample, subjects placed a mark on the scale corresponding to his/her perception of the stimulus. The mean of the two replicates was calculated and the results were plotted for each subject. This procedure generates suprathreshold intensity functions for the two compounds [28,40]. If the NaCl ratings increased more rapidly across concentrations than did the PROP ratings, the subject was classified as a nontaster. If the PROP rating increased more rapidly than did the NaCl rating, the subject was classified as a supertaster. If the PROP rating overlapped with the NaCl rating, subjects was classified as medium tasters.

PROP thresholds were determined for each subject at the third visit. All rinsed their mouth with spring water before the experimental session. They were presented with 3 cups positioned in a random order, one with a given PROP concentration and two containing spring water. They were instructed to swish the entire contents of one cup in their mouth for 5 s and then to spit it out. Before moving onto the next cup, they rinsed their mouth with spring water. After tasting all 3 samples, they were asked to choose which one was different from the other two samples. The detection threshold was designated as the lowest concentration at which the subject correctly identified the target stimulus on three consecutive trials. The interstimulus interval as well as intertrial interval was set at 60 s.

#### 2.5. Statistical analyses

Three-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare PROP intensity ratings with NaCl intensity ratings across taster groups (nontaster, medium taster and supertaster). One-way ANOVA was used across taster groups to compare mean values ± SE for PROP thresholds and suprathreshold (3.2 mM) bitterness ratings. The Tukey test was used for post-hoc comparisons. The relationships between PROP suprathreshold bitterness and threshold values were assessed using linear correlation analysis. Fisher's method (Genepop software version 4.0; <http://kimura.univ-montp2fr/~rousset/Genepop.htm>) [49] was used to test TAS2R38 genotype distribution and haplotype frequencies, and genotype distribution and allele frequencies of gustin gene polymorphism rs2274333 (A/G) according to PROP status. Genetic differences between the three taster groups based on the distribution of the TAS2R38 and gustin gene genotype combinations were tested by the Markov Chain method (Arlequin software version 3.1; <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>) [50].

A quantitative analysis of the contribution of the TAS2R38 and gustin gene loci to PROP bitterness and threshold was performed using the Generalized Linear Model (GLM) procedure. The GLM procedure provides regression analysis and analysis of variance for one dependent variable by one or more independent variables. The GLM was carried out through a backward stepwise procedure, starting with the full model, including independent variables and second order interactions between them, and deleting step by step non-significant interactions and variables. The different effects between the heterozygous and the homozygous condition were analyzed for both genes. The effect of interaction between the two genes was also included in the model. The Partial Eta Squared represents the strength of the association of each independent variable (genotypes of TAS2R38 and gustin gene loci) with the dependent variable (bitterness or threshold), after the effects of all other independent variables were accounted for. The GLM procedure was used to estimate the expected

bitterness and threshold mean values for each combination of the *TAS2R38* and gustin gene genotypes. The degree of overlap between the expected and the observed mean values defined to what extent PROP bitterness and threshold are explained by the *TAS2R38* and gustin gene loci. The global R Squared offers a measure of this association. Individuals with rare haplotypes were excluded from GLM analysis. Statistical analyses were conducted using STATISTICA for WINDOWS (version 7.0; StatSoft Inc, Tulsa, OK, USA) and SPSS software (SPSS Inc. Headquarters, Chicago, IL, USA).  $p$  values <0.05 were considered significant.

### 3. Results

Based on their taster group assignments, 27.63% of the subjects were nontasters ( $n=21$ ); 36.84% were medium tasters ( $n=28$ ); and 35.52% were supertasters ( $n=27$ ). Three-way ANOVA revealed a significant three-way interaction of Taster group  $\times$  Solution type  $\times$  Concentration on the intensity ratings ( $F_{[4,438]}=21.438$ ;  $p<0.0001$ ) (Fig. 1). Post-hoc comparisons showed that nontasters gave lower intensity ratings at the two highest concentrations of PROP as compared to the two highest concentrations of NaCl, respectively ( $p<0.0001$ ; Tukey test). Medium tasters gave similar ratings for PROP and NaCl at all concentrations ( $p>0.05$ ; Tukey test). Supertasters gave higher ratings to 0.32 and 3.2 mmol/l PROP as compared to the two highest concentrations of NaCl, respectively ( $p<0.0001$ ; Tukey test).

One-way ANOVA showed that PROP threshold and bitterness intensity (3.2 mM) varied with taster status (threshold:  $F_{[2,69]}=18.260$ ;  $p<0.0001$ ; bitterness:  $F_{[2,69]}=85.464$ ;  $p<0.0001$ ) (Fig. 2). Post-hoc comparisons showed that mean thresholds were statistically higher in nontasters relative to the other groups ( $p=0.0001$ ; Tukey test), but not different between medium and supertasters ( $p>0.05$ ; Tukey test). As expected, PROP suprathreshold bitterness intensity (3.2 mM) was statistically higher in supertasters than it was in medium tasters, and medium tasters gave higher intensity ratings to PROP than nontasters ( $p=0.0001$ ; Tukey test).

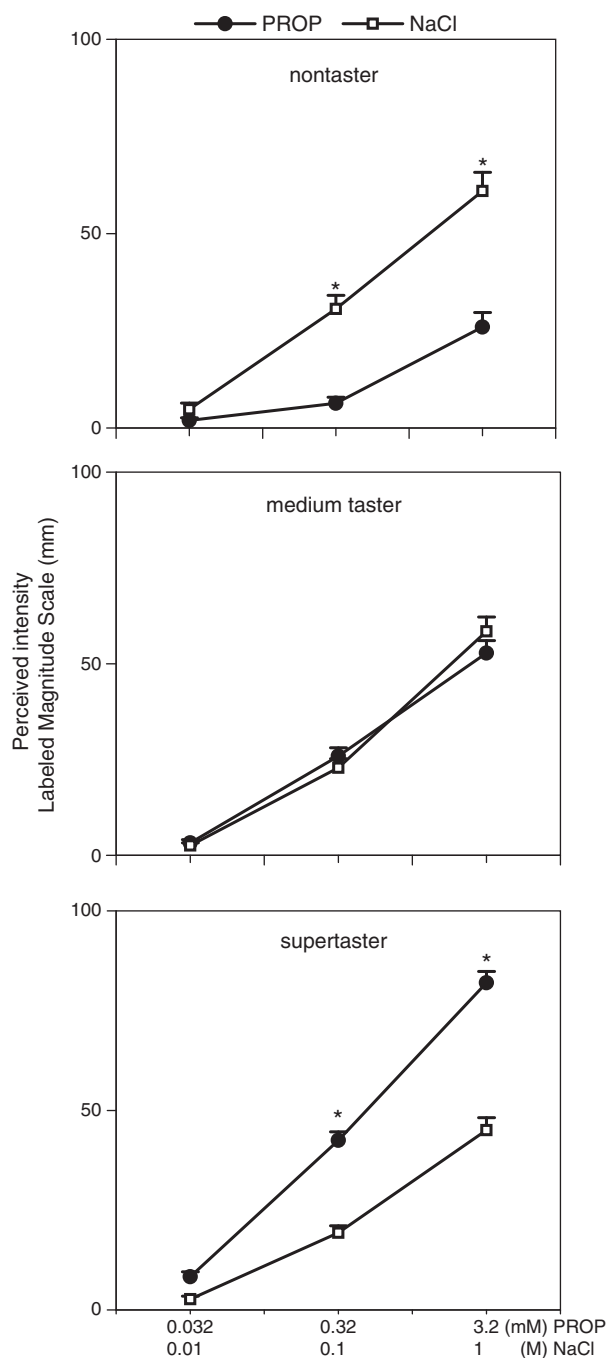
The *TAS2R38* SNPs were associated with PROP taster status based on genotype distribution and haplotype frequencies ( $\chi^2>50.00$ ;  $p<0.0001$ ; Fisher's test) (Table 1). Post hoc comparison showed that the genotype AVI/AVI and haplotype AVI were more frequent (95.00% and 97.50%, respectively) in nontasters than in the other groups ( $\chi^2>50.00$ ;  $p<0.0001$ ; Fisher's test). Supertasters were not different statistically from medium tasters (genotypes  $\chi^2=4.52$ ;  $p=0.104$  and haplotypes  $\chi^2=2.89$ ;  $p=0.23$ ; Fisher's test). Few rare haplotypes were found in our sample ( $n=76$ ): two haplotypes AAV were found in supertasters, one AAI in medium tasters, and one AAI in nontasters (the statistical differences with and without their inclusion in the analysis were the same).

Molecular analysis of the rs2274333 (A/G) gustin gene polymorphism showed that the three PROP taster groups differed statistically based on their gustin genotype ( $\chi^2=24.334$ ;  $p<0.0001$  Fisher's test) and allelic frequencies ( $\chi^2=32.684$ ;  $p<0.0001$ ; Fisher's test) (Table 2). In this case, pairwise comparisons discriminated all groups from each other ( $\chi^2>10.254$ ;  $p<0.006$ ; Fisher's test). Supertasters had a very high frequency of genotype AA (85.19%) and allele A (92.6%), whereas nontasters had a higher frequency of genotype GG (57.14%) and allele G (64.28) (genotypes  $\chi^2=26.053$ ;  $p<0.0001$  and alleles  $\chi^2=34.563$ ;  $p<0.0001$ ; Fisher's test). Allele A was also more frequent (69.64%) than allele G (30.35%) in medium tasters.

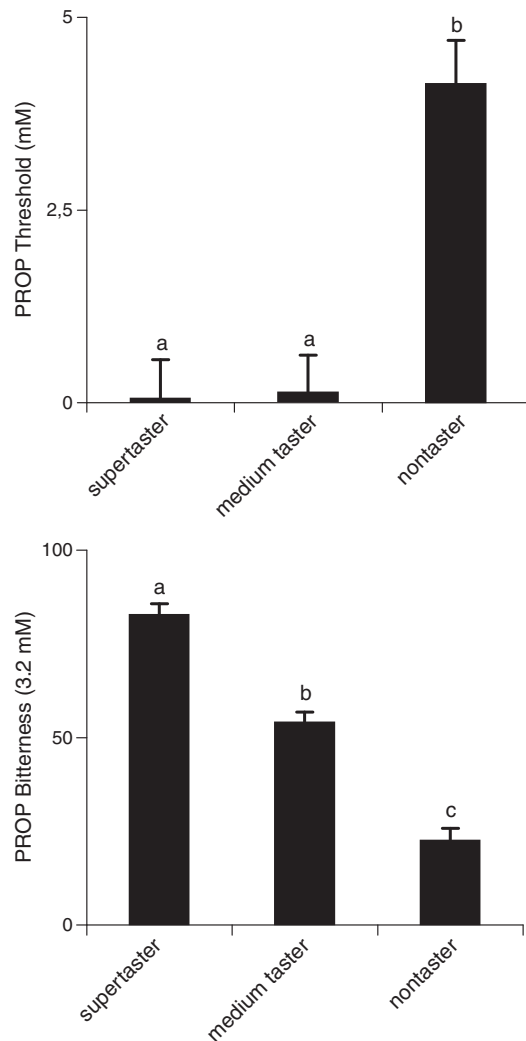
The three taster groups differed statistically based on the distribution of the *TAS2R38* and gustin gene genotype combinations ( $p<0.0001$ ; Markov Chain method) (Table 3). Post hoc comparison discriminated all groups from each other ( $p\leq 0.04545$ ; Markov Chain method). The homozygous condition of the insensitive alleles at both loci (AVI/AVI–GG) was most frequent (55%) in nontasters ( $p<0.0001$ ; Markov Chain method). The homozygous condition of the sensitive gustin locus (AA) combined with PAV homozygous or heterozygous

(PAV/AVI–AA and PAV/PAV–AA) were more represented in supertasters (48% and 32%), while in medium tasters, PAV heterozygous together with AA or AG genotype (PAV/AVI–AA and PAV/AVI–AG) were more frequent (40.74% and 37.04%).

Fig. 3 shows the scatterplot depicting the typical negative linear correlation between PROP suprathreshold bitterness intensity and PROP threshold ( $r=-0.71$ ;  $p<0.0001$ ). Individuals are identified in the plot by their taster status, *TAS2R38* and gustin gene genotypes. Nontasters with insensitive alleles at both loci (AVI/AVI–GG) had the highest thresholds and gave the lowest bitterness intensity ratings to PROP, whereas those with the AVI/AVI–AA genotype combination



**Fig. 1.** Mean intensity ratings ( $\pm$ SE) for PROP and NaCl in subjects classified as PROP nontasters ( $n=21$ ), medium tasters ( $n=28$ ) and supertasters ( $n=27$ ). Three-way ANOVA was used to compare PROP intensity ratings with NaCl intensity ratings across groups ( $p<0.001$ ). \* = significant difference between PROP and the corresponding NaCl concentration ( $p<0.0001$ ; Tukey test).



**Fig. 2.** PROP threshold and bitterness intensity ratings (3.2 mM) in supertasters ( $n = 27$ ), medium tasters ( $n = 28$ ) and nontasters ( $n = 21$ ). All values are mean ( $\pm$  SE). One-way ANOVA was used to compare values across taster groups ( $p < 0.0001$ ). Different letters indicate significant differences ( $p < 0.0001$ ; Tukey test).

showed a less extreme phenotype. Supertasters with sensitive alleles at both loci (PAV/PAV-AA) had the lowest thresholds and gave highest PROP bitterness intensity ratings, while those with the PAV/AVI-AA genotype combination showed a less sensitive phenotype. Medium tasters with the PAV/AVI-AA combination seemed to have lower thresholds than PAV/AVI-AG individuals.

**Table 1**  
Genotype distribution and haplotype frequencies of *TAS2R38* SNPs according to PROP taster status.

	PROP status						<i>p</i> -value <sup>a</sup>
	Supertaster		Medium taster		Nontaster		
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
<i>Genotype</i>							
PAV/PAV	10	40.00	4	14.81	0	0	<0.0001
AVI/AVI	1	4.00	1	3.70	19	95.00	
PAV/AVI	14	56.00	22	81.48	1	5.00	
<i>Haplotype</i>							
PAV	34	68.00	30	55.56	1	2.50	<0.0001
AVI	16	32.00	24	44.44	40	97.50	

<sup>a</sup> *p*-value derived from Fisher's method ( $n = 72$ ).

**Table 2**  
Genotype distribution and allele frequencies of gustin (CA6) polymorphism rs2274333 (A/G) according to PROP taster status.

	PROP status						<i>p</i> -value <sup>a</sup>
	Supertaster		Medium taster		Nontaster		
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
<i>Genotype</i>							
AA	23	85.19	14	50.00	6	28.57	<0.0001
GG	0	0	3	10.71	12	57.14	
AG	4	14.81	11	39.28	3	14.29	
<i>Allele</i>							
A	50	92.59	39	69.64	15	35.71	<0.0001
G	4	7.40	17	30.35	27	64.28	

<sup>a</sup> *p*-value derived from Fisher's method ( $n = 76$ ).

The GLM procedure defined the contribution of the *TAS2R38* and gustin (CA6) gene loci in modulating quantitatively the PROP bitterness intensity (the Global R Squared was 0.598). In particular, the model applied highlights a significant association between PROP bitterness and heterozygous PAV/AVI (Partial Eta Squared 0.274;  $p < 0.001$ ) or homozygous PAV/PAV (Partial Eta Squared 0.424;  $p < 0.001$ ). A significant association with PROP bitterness was also found for homozygous AA (Partial Eta Squared 0.128;  $p = 0.003$ ); no association was observed between PROP bitterness and heterozygous AG (Partial Eta Squared 0.033;  $p = 0.136$ ). Also, no significant interaction between the *TAS2R38* and gustin gene loci was detected.

The GLM procedure also defined the contribution of the two loci in modulating quantitatively the PROP threshold, and in this case the global R Squared was 0.413. For threshold measurements, the GLM model showed significant associations between threshold and heterozygous PAV/AVI (Partial Eta Squared 0.129;  $p = 0.002$ ) or homozygous PAV/PAV (Partial Eta Squared 0.111;  $p = 0.005$ ), and heterozygous AG (Partial Eta Squared 0.103;  $p = 0.007$ ) or homozygous AA (Partial Eta Squared 0.149;  $p = 0.001$ ). Also for the threshold, no significant interaction between the *TAS2R38* and gustin gene loci was found.

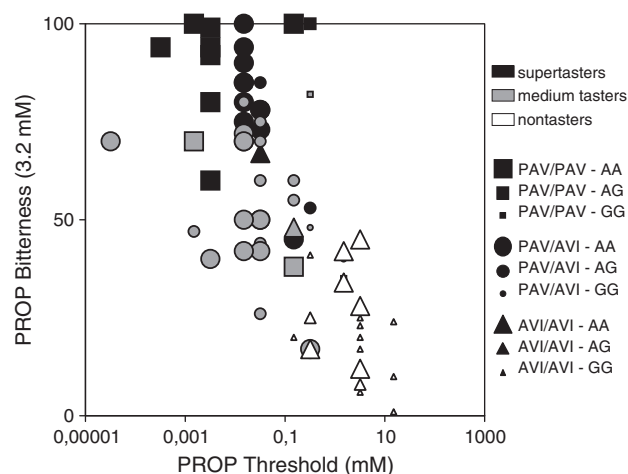
Table 4 shows mean values ( $\pm$  SE) of PROP bitterness intensity and threshold observed for each *TAS2R38* and gustin gene genotype combination and the expected mean values estimated by the GLM model. The expected PROP bitterness mean values ranged from 16.3 in AVI/AVI-GG individuals to 83.9 in PAV/PAV-AA, and the expected values had high degree of overlap with the observed ones (Global R Squared = 0.598). The model showed that having two copies of AA alleles in the gustin gene increased the bitterness intensity in each *TAS2R38* genotype group, and the progression across groups was

**Table 3**  
Distribution of the *TAS2R38* and gustin gene genotype combinations according to PROP taster status.

	PROP status						<i>p</i> -value <sup>a</sup>
	Supertaster		Medium taster		Nontaster		
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
<i>Genotype</i>							
AVI/AVI-GG	0	0	0	0	11	55.00	<0.0001
AVI/AVI-AG	0	0	0	0	2	10.00	
AVI/AVI-AA	1	4.00	1	3.70	6	30.00	
PAV/AVI-GG	0	0	1	3.70	1	5.00	
PAV/AVI-AG	2	8.00	10	37.04	0	0	
PAV/AVI-AA	12	48.00	11	40.74	0	0	
PAV/PAV-GG	0	0	2	7.41	0	0	
PAV/PAV-AG	2	8.00	0	0	0	0	
PAV/PAV-AA	8	32.00	2	7.41	0	0	

<sup>a</sup> *p*-value derived from the Markov Chain method ( $n = 72$ ).





**Fig. 3.** Scatterplots depicting the relationship between PROP bitterness intensity and threshold ( $r = -0.71$ ;  $p < 0.0001$ ; linear correlation analysis). Individuals ( $n = 72$ ) identified by their PROP taster status, *TAS2R38* and gustin (CA6) genotypes.

nearly perfect. For the threshold measurements, the mean expected values estimated by the GLM model partially overlapped with the observed values (Global R Squared = 0.413). In this case, the model showed that a single allele A in the gustin gene reduced the threshold value. Finally, there was a significant association between heterozygous AG and threshold (Partial Eta Squared 0.103;  $p = 0.007$ ) but no association between heterozygous AG and bitterness intensity (Partial Eta Squared 0.033;  $p = 0.136$ ).

#### 4. Discussion

A primary aim of the present study was to determine whether modulation of PROP bitter taste phenotype is determined by a combination of haplotypes of the *TAS2R38* gene and polymorphism rs2274333 (A/G) of the gustin gene that resides on chromosome 1. The analysis of genotype distribution and allele frequencies of the *TAS2R38* and gustin gene according to PROP status showed that the *TAS2R38* distinguished only tasters from nontasters, whereas the gustin gene differentiated all three PROP taster groups. Moreover, this analysis together with analysis of the distribution of the two loci genotype combinations showed that the *TAS2R38* locus characterizes genetically nontaster individuals, while gustin gene locus characterizes supertasters. Furthermore, the lowest responsiveness to PROP in nontasters was strongly associated with the AVI nontasting variant of

*TAS2R38* (97.5% of nontasters carried AVI haplotype and 95% were AVI homozygous) in those with at least 1 allele G of gustin gene locus. On the other hand, the highest PROP responsiveness in supertasters was strongly associated with allele A and AA genotype (93% of supertasters carried allele A and 85% are A homozygous). We previously showed that the G allele at this locus of gustin was associated with reduced functional activity of the gustin protein, whereas the A allele at this location was associated with full functionality of the protein [37]. Together these findings support the hypothesis that the greater ability of supertasters to discriminate both bitter and non-bitter oral stimuli could be mediated by a greater taste-bud density due to a fully functional gustin protein which, as a trophic factor, promotes growth and development of taste buds [51].

We performed a quantitative analysis of the contribution of the *TAS2R38* and gustin gene loci to PROP bitter taste phenotype modulation using a threshold method, which assesses the ability to discriminate low concentrations of the chemical, and by suprathreshold intensity ratings which assess taste intensity at higher concentrations. The GLM analysis showed that the *TAS2R38* and gustin loci had independent effects in modulating the PROP phenotype. However, the two loci accounted for up to 60% of the phenotypic variance in PROP bitterness intensity but up to only 40% of the variance in PROP threshold. These findings suggest that other as yet unknown factors may be relevant in detecting low concentrations of PROP. We are currently examining this possibility.

The stronger association between PROP bitterness and the *TAS2R38* locus suggests that PROP suprathreshold intensity ratings are mainly determined by the *TAS2R38* locus (with respect to the gustin gene locus). These findings are consistent with studies using functionally-expressed human receptor variants showing that the PAV variant of *TAS2R38* is necessary to respond to PROP across increasing concentrations [30]. Our findings do not rule out the involvement of other modifying genes which are known to play a role in PROP tasting [35,36].

On the other hand, the similar association between the two loci and threshold values indicates that both *TAS2R38* and gustin gene loci are important for discriminating low concentrations of the chemical. Notably, the presence of a single A allele in the gustin gene was sufficient for individuals to exhibit decreased thresholds regardless of *TAS2R38* genotype group, while two copies of AA alleles are needed to determine increased bitterness intensity. Thus, we speculate that the ability to detect PROP at low concentrations may be related to the activity of the gustin protein, which is thought to play a role in taste bud development and maintenance. To confirm this possibility, future studies will directly measure taste papillae/taste bud densities in individuals defined by *TAS2R38* and gustin gene loci.

In conclusion, this work recapitulates earlier work [26] showing that *TAS2R38* cannot explain supertasting, and extends it by identifying a new candidate polymorphism that may partially explain supertasting. Moreover, our findings help to explain some common inconsistencies reported in the literature, such as AVI homozygotes who perceive more bitterness from PROP than would be expected based on their genotype, or PAV/AVI heterozygotes who respond like supertasters [26,30]. These novel insights strengthen our understanding of the effects of this phenotype on human eating behavior and will further the goal of designing personalized dietary strategies.

#### Acknowledgments

This work was supported by the Italian Ministry of University and Research and by a grant from "Fondazione Banco di Sardegna". The authors thank the volunteers, without whose contribution this study would not be possible. We also thank, Dr. Caterina Chillotti (P.O. San Giovanni di Dio, Cagliari, Italy) for running clinical trials and Sebastiano Banni (University of Cagliari, Italy) for critically reviewing the manuscript.

**Table 4**  
PROP bitterness intensity and threshold values according to *TAS2R38* and gustin (CA6) loci.

Genotype	PROP bitterness		PROP threshold	
	Obs	Exp	Obs	Exp
AVI/AVI-GG	17.9 ± 3.34	16.3	5.88 ± 1.80	5.23
AVI/AVI-AG	16.5 ± 8.50	27.6	1.76 ± 1.44	2.46
AVI/AVI-AA	36.6 ± 6.30	36.0	1.64 ± 0.50	2.36
PAV/AVI-GG	44.0 ± 4.00	47.0	0.91 ± 0.59	2.78
PAV/AVI-AG	58.2 ± 4.96	58.3	0.07 ± 0.03	0.01
PAV/AVI-AA	67.0 ± 4.38	66.7	0.04 ± 0.01	−0.09
PAV/PAV-GG	58.5 ± 23.50	64.2	0.91 ± 0.59	2.62
PAV/PAV-AG	87.5 ± 12.50	75.6	0.17 ± 0.15	−0.15
PAV/PAV-AA	82.7 ± 6.57	83.9	0.03 ± 0.02	−0.25
Global R Squared	0.598		0.413	

Mean values of PROP bitterness intensity (3.2 mM) and threshold (mM) observed (Obs) in the trials (± SE) and expected (Exp) through Generalized Linear Model (GLM) analysis ( $n = 72$ ).

## References

- [1] Kalmus H. Improvements in the classification of the tasters genotypes. *Ann Hum Genet* 1958;22:222–30.
- [2] Fox AF. The relationship between chemical constitution and taste. *Proc Natl Acad Sci USA* 1932;18:115–20.
- [3] Harris H, Kalmus H. Chemical sensitivity in genetical differences of taste sensitivity. *Ann Eugen* 1949;15:32–45.
- [4] Fahey JD, Zalcmann AT, Talalay P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemical* 2001;56:5–51.
- [5] Delange F. The role of iodine in brain development. *Proc Nutr Soc* 2000;59:75–9.
- [6] Wooding S, Kim UK, Bamshad MJ, Larsen J, Jorde LB, Drayna D. Natural selection and molecular evolution in PTC, a bitter-taste receptor gene. *Am J Hum Genet* 2004;74:637–46.
- [7] Duffy VB, Hayes JE, Davidson AC, Kidd JR, Kidd KK, Bartoshuk LM. Vegetable intake in college-aged adults is explained by oral sensory phenotypes and TAS2R38 genotype. *Chem Senses* 2010;35:137–48.
- [8] Dinehart ME, Hayes JE, Bartoshuk LM, Lanier SL, Duffy VB. Bitter taste markers explain variability in vegetable sweetness, bitterness, and intake. *Physiol Behav* 2006;87:304–13.
- [9] Hayes J, Duffy VB. Revisiting sucrose–fat mixtures: sweetness and creaminess vary with phenotypic markers of oral sensation. *Chem Senses* 2007;32:225–36.
- [10] Keller KL, Steinmann L, Nurse RJ, Tepper BJ. Genetic taste sensitivity to 6-n-propylthiouracil influences food preference and reported food intake in preschool children. *Appetite* 2002;38:3–12.
- [11] Tepper BJ, Nurse RJ. Fat perception is related to PROP taster status. *Physiol Behav* 1997;61:949–54.
- [12] Tepper BJ, Nurse RJ. PROP taster status is related to the perception and preference for fat. *Ann NY Acad Sci* 1998;855:802–4.
- [13] Duffy VB, Bartoshuk LM, Lucchina LA, Snyder DJ, Tym A. Supertasters of PROP (6-n-propylthiouracil) rate the highest creaminess to high-fat milk products. *Chem Senses* 1996;21:598.
- [14] Tepper BJ. Nutritional implications of genetic taste variation: the role of PROP sensitivity and other taste phenotypes. *Annu Rev Nutr* 2008;28:367–88.
- [15] Tepper BJ, Neilland M, Ullrich NV, Koelliker Y, Belzer LM. Greater energy intake from a buffet meal in lean, young women is associated with the 6-n-propylthiouracil (PROP) non-taster phenotype. *Physiol Behav* 2011;56(1):104–10.
- [16] Drewnowski A, Henderson SA, Cockcroft JE. Genetic sensitivity to 6-n-propylthiouracil has no influence on dietary patterns, body mass indexes, or plasma lipid profiles of women. *J Am Diet Assoc* 2007;107(8):1340–8.
- [17] Guo SW, Reed DR. The genetics of phenylthiocarbamide perception. *Ann Hum Biol* 2001;28:111–42.
- [18] Blakeslee AF, Fox AL. Our different taste worlds. *J Hered* 1932;23:97–107.
- [19] Tepper BJ, Koelliker Y, Zhao L, Ullrich NV, Lanzara C, P d'Adamo, et al. Variation in the bitter-taste receptor gene TAS2R38, and adiposity in a genetically isolated population in Southern Italy. *Obesity* 2008;16(10):2289–95.
- [20] Prodi DA, Drayna D, Forabosco P, Palmas MA, Mastrale GB, Piras D, et al. Bitter taste study in a sardinian genetic isolate supports the association of phenylthiocarbamide sensitivity to the TAS2R38 bitter receptor gene. *Chem Senses* 2004;29(8):697–702.
- [21] Bartoshuk LM. The biological basis of food perception and acceptance. *Food Qual Preference* 1993;4:21–32.
- [22] Bartoshuk LM, Duffy VB, Miller IJ. PTC/PROP tasting: anatomy, psychophysics, and sex effects. *Physiol Behav* 1994;56:1165–71.
- [23] Bartoshuk LM, Duffy VB, Lucchina LA, Prutkin JM, Fast K. PROP (6-n-propylthiouracil) supertasters and the saltiness of NaCl. *Ann NY Acad Sci* 1998;855:793–6.
- [24] Duffy VB, Bartoshuk LM. Food acceptance and genetic variation in taste. *J Am Diet Assoc* 2000;100:647–55.
- [25] Duffy VB, Davidson AC, Kidd JR, Kidd KK, Speed WC, Pakstis AJ, et al. Bitter receptor gene (TAS2R38), 6-n-propylthiouracil (PROP) bitterness and alcohol intake. *Alcohol Clin Exp Res* 2004;28:1629–37.
- [26] Hayes JE, Bartoshuk LM, Kidd JR, Duffy VB. Supertasting and PROP bitterness depends on more than the TAS2R38 gene. *Chem Senses* 2008;33:255–65.
- [27] Bajec MR, Pickering GJ. Thermal taste, PROP responsiveness, and perception of oral sensations. *Physiol Behav* 2008;95(4):581–90.
- [28] Tepper BJ, Cao J, Christensen CM. Development of brief methods to classify individuals by PROP taster status. *Physiol Behav* 2001;73:571–7.
- [29] Yeomans MR, Prescott J, Gould NJ. Acquired hedonic and sensory characteristics of odours: influence of sweet liker and propylthiouracil taster status. *Q J Exp Psychol* 2009;62(8):1648–64.
- [30] Bufo B, Breslin PA, Kuhn C, Reed DR, Sharp CD, Slack JP, et al. The molecular basis of individual differences in phenylthiocarbamide and propylthiouracil bitterness perception. *Curr Biol* 2005;15:322–7.
- [31] Yackinos C, Guinard JX. Relation between PROP taster status and fat perception, touch, and olfaction. *Physiol Behav* 2001;72:427–37.
- [32] Essick GK, Chopra A, Guest S, McGlone F. Lingual tactile acuity, taste perception, and the density and diameter of fungiform papillae in female subjects. *Physiol Behav* 2003;80:289–302.
- [33] Kim UK, Jorgenson E, Coon H, Leppert M, Risch N, Drayna D. Positional cloning of the human quantitative trait locus underlying taste sensitivity to phenylthiocarbamide. *Science* 2003;299:1221–5.
- [34] Olson JM, Boehnke M, Neiswanger K, Roche AF, Siervogel RM. Alternative genetic models for the inheritance of the phenylthiocarbamide taste deficiency. *Genet Epidemiol* 1989;6:423–34.
- [35] Drayna D, Coon H, Kim UK, Elsnert T, Cromer K, Otterud B, et al. Genetic analysis of a complex trait in the Utah Genetic Reference Project: a major locus for PTC taste ability on chromosome 7q and a secondary locus on chromosome 16p. *Hum Genet* 2003;112:567–72.
- [36] Reed DR, Zhu G, Breslin PA, Duke FF, Henders AK, Campbell MJ, et al. The perception of quinine taste intensity is associated with common genetic variants in a bitter receptor cluster on chromosome 12. *Hum Mol Genet* 2010;19:4278–85.
- [37] Padiglia A, Zonza A, Atzori E, Chillotti C, Calò MC, Tepper BJ, et al. Sensitivity to 6-n-propylthiouracil (PROP) is associated with gustin (CA6) gene polymorphism, salivary zinc and BMI in humans. *Am J Clin Nutr* 2010;92:539–45.
- [38] Lawless H. A comparison of different methods used to assess sensitivity to the taste of phenylthiocarbamide (PTC). *Chem Senses* 1980;5:247–56.
- [39] Zhao L, Kirkmeyer SV, Tepper BJ. A paper screening test to assess genetic taste sensitivity to 6-n-propylthiouracil. *Physiol Behav* 2003;78:625–33.
- [40] Tepper BJ, Ullrich NV. Influence of genetic taste sensitivity to 6-n-propylthiouracil (PROP), dietary restraint and disinhibition on body mass index in middle-age women. *Physiol Behav* 2002;75:305–12.
- [41] Stunkard A, Messick S. The three-factor eating questionnaire to measure dietary restraint, disinhibition, and hunger. *J Psychosom Res* 1985;29:71–83.
- [42] Rankin KM, Godinot N, Christensen CM, Tepper BJ, Kirkmeyer SV. Assessment of different methods for 6-n-propylthiouracil status classification. In: Prescott J, Tepper BJ, editors. Genetic variation in taste sensitivity. New York: Marcel Dekker; 2004. p. 63–88.
- [43] Weiffenbach JM, Baum BJ, Burghauer R. Taste threshold: quality specific variation with human aging. *J Gerontol* 1982;37:372–7.
- [44] ASTM. Standard practice for determination of odor and taste threshold by a force-choice method of limits. West Conshohocken (PA): American Society for Testing and Materials; 2004. p. E679.
- [45] Chalè-Rush A, Burgess JR, Mattes RD. Evidence for human orosensory (taste?) sensitivity to free fatty acids. *Chem Senses* 2007;32:423–31.
- [46] Sanguineti CJ, Dias Neto E, Simpson SJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 1994;17:914–21.
- [47] Glanville EV, Kaplan AR. Taste perception and the menstrual cycle. *Nature* 1965;205:930–1.
- [48] Green BG, Shaffer GS, Gilmore MM. Derivation and evaluation of a semantic scale of oral sensation magnitude with apparent ratio properties. *Chem Senses* 1993;18:683–702.
- [49] Rousset F. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resour* 2008;8:103–6.
- [50] Excoffier L, Laval LG, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 2005;1:47–50.
- [51] Henkin RI, Martin BM, Agarwal RP. Efficacy of exogenous oral zinc in treatment of patients with carbonic anhydrase VI deficiency. *Am J Med Sci* 1999;318:392–405.

III

# A Rapid Screening Method for the Identification of a Single-Nucleotide Polymorphism in the Carbonic Anhydrase VI Gene in Studies of Sensitivity to the Bitter Taste of 6-n-Propylthiouracil

Iole Tomassini Barbarossa,<sup>1</sup> Elena Atzori,<sup>2</sup> Andrea Zonza,<sup>1</sup> and Alessandra Padiglia<sup>2</sup>

The ability to perceive the bitter taste of 6-n-propylthiouracil (PROP) is a variable phenotype that has been associated with body mass index (in kg/m<sup>2</sup>) and linked to food choice and satiety. PROP-sensitive and -nonsensitive individuals are defined as tasters and nontasters, respectively. Sensitivity to PROP is a heritable trait based on the *TAS2R38* gene on chromosome 7q34. In a recent study we demonstrated an association between PROP sensitivity and the single-nucleotide polymorphism (SNP) rs2274333 (+292A/G) within a coding sequence of the gustin/carbonic anhydrase VI gene. The purpose of this study was to develop a rapid and inexpensive screening method for identification of the rs2274333 SNP in individuals with varying sensitivity to PROP. Our results show that the methodology employed allows distinguishing A/G alleles perfectly, with a simple DNA digestion of a polymerase chain reaction fragment covering the SNP site of interest. So, the polymerase chain reaction followed by restriction fragment length polymorphism assay described in this article can be used as an alternative to sequencing in bitter taster status research, and could be employed as a survey tool in nutrigenomic studies.

## Introduction

**S**ENSITIVITY TO THE bitter taste of thiourea, in the forms of phenylthiocarbamide and 6-n-propylthiouracil (PROP), varies widely among individuals. The ability to perceive the bitter taste of PROP is the more common phenotype, and has been associated with body mass index, food choice, and satiety (Tepper, 2008). The individual variability to taste thioureas is a heritable trait, depending on alleles of the *TAS2R38* gene, which expresses a receptor that binds the N-C=S group, allowing perception of bitter taste in response to thiourea (Fox, 1932; Harris and Kalmus, 1949; Guo and Reed, 2001). Kim *et al.* (2003) cloned the *TAS2R38* gene (SWISS-PROT accession number P59533), a member of the bitter taste receptor family, and identified three nonsynonymous coding single-nucleotide polymorphisms (SNPs) (Pro49Ala, Ala262Val, and Val296Ile) giving rise to two common molecular haplotypes of this receptor (PAV and AVI, depending on the amino acid present at each SNP). The human haplotype PAV is associated with tasting, whereas the other common form, AVI, is associated with nontasting.

Recently, Padiglia *et al.* (2010) introduced another factor to the genetic basis of bitter tasting by demonstrating an asso-

ciation between the PROP phenotype and a SNP within the carbonic anhydrase VI (CA6) gene (SWISS-PROT accession number P23280), which is assumed to be a taste buds trophic factor (Henkin *et al.*, 1988). The CA6 SNP is an A-to-G transition at position 292 (+292A/G) of exon 3, resulting in substitution of the Ser residue with Gly at position 90 of the mature protein. The G allele of +292A/G, which has been associated with conformational changes of the protein, could establish a mechanistic link between PROP nontaster status and reduced taste bud density and functionality (Padiglia *et al.*, 2010). Recently, a study demonstrated that insensitivity to PROP was associated with increased adiposity in women, and might be linked to increased selection of dietary fats (Tepper *et al.*, 2010). Earlier investigations suggested that nontasters may not experience the bitter taste of nicotine in cigarettes, leading to an increased risk to health due to prolonged smoking (Duffy *et al.*, 2004). Some authors have also shown that PROP bitterness is associated with oral sensations from alcohol. Individuals who taste PROP as most bitter may experience more negative oral sensations from alcoholic beverages (bitterness and irritation) and fewer positive sensations (sweetness), and therefore experience a sensory hindrance of overconsumption (Guinard *et al.*, 1996; Intranuovo

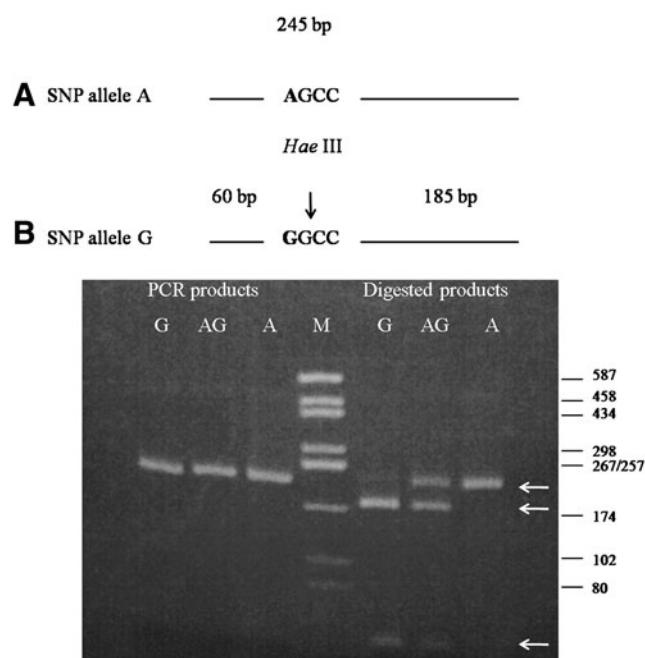
<sup>1</sup>Department of Experimental Biology, Section of General Physiology and <sup>2</sup>Department of Life and Environment Sciences, Section of Biochemistry and Molecular Biology, University of Cagliari, Monserrato, Italy.





assay. Since this SNP changes the codon from CAG to CGG generating the nucleotide sequence GGCC recognized by *Hae*III, it was possible to employ the fast and inexpensive proposed method. As previously described, fragments of 245 bp covering the SNP of interest, were first amplified in triplicate for each DNA sample, and subsequently digested with *Hae*III. Since the restriction enzyme recognizes only sequences with the G allele, the resulting digested fragments revealing the genotype of each individual were analyzed on polyacrylamide gel with the untreated PCR products. Presence of the G allele of the +292A/G SNP results in digestion of the 245 bp PCR product into two fragments of 185 and 60 bp. Presence of the A allele removes the *Hae*III digestion site. A heterozygous individual would therefore have three fragments of 245, 185, and 60 bp (Fig. 2). The results of DNA electrophoretic profiles after digestion were compared with electropherogram data by direct sequencing of the same PCR samples, obtaining a full correspondence (100%) between the two methods.

As expected, we observed that 17 out of 20 supertasters analyzed showed undigested PCR products, meaning the homozygous presence of the A allele. Three out 20 supertasters showed an electrophoretic profile consisting of an undigested fragment of 245 bp and two smaller fragments of



**FIG. 2.** Assay design (A) and example of the results (B) obtained using polymerase chain reaction (PCR)–restriction fragment length polymorphism method. A 245 bp fragment of carbonic anhydrase VI gene covering the SNP site of interest was first amplified and subsequently digested with *Hae*III restriction enzyme that recognizes only the G allele. The resulting fragments revealing the genotype of each individual were analyzed on polyacrylamide gel in parallel with the untreated PCR products. M, size marker; G, A/G, and G correspond to the SNP alleles of each genotype. The arrows indicate the DNA fragments (245, 180, and 60 bp) obtained after *Hae*III restriction enzyme digestion. The gel was stained with ethidium bromide.

**TABLE 1.** POLYMORPHISM +292A/G DEDUCED BY POLYMERASE CHAIN REACTION–RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM ANALYSIS AND ITS CORRELATION WITH 6-N-PROPYLTHIOURACIL PHENOTYPE

	Phenotype (n=60)		
	Super taster (n=20)	Medium taster (n=20)	Nontaster (n=20)
Genotype (RFLP products)			
AA (245 bp product)	17	10	5
AG (245/185/60 bp products)	3	7	4
GG (185/60 bp products)	0	3	11
Alleles A frequencies (undigested PCR products)	92.5%	67.5%	35%

PCR, polymerase chain reaction; RFLP, restriction fragment length polymorphism.

185 and 60 bp product of enzymatic digestion, confirming the presence of both AG alleles. Nobody from this group had the GG genotype (Table 1). Eleven out of 20 nontasters showed an electrophoretic profile consisting of two digested fragments of 185 and 60 bp, corresponding to the homozygous presence of the G allele, 4 were heterozygous AG and 5 had the AA genotype, exhibiting partially and nondigested PCR fragments, respectively. Thus, 92.5% of the supertasters carried the A allele, whereas 65.00% of nontasters carried the G allele at this location. In medium tasters the undigested products linked to presence of allele A were more frequent (67.5%) than fully digested products related to the presence of allele G (Table 1).

## Conclusion

Until recently, *TAS2R38* was considered the only gene involved in bitter taste variation in humans, but new data suggest that *CA6* gene polymorphisms may also contribute to variation in PROP taste sensitivity and impact food perception and preference (Padiglia *et al.*, 2010). Using a PCR-RFLP technique, we established a simple, low-cost, and efficient method that can be used to determine the *CA6* +292A/G SNP genotype, in bitter taste studies. In fact, the results obtained, also confirmed by direct sequencing data, showed the three genotypes (AA, GG, and AG) expected in the population studied for SNP rs2274333. In summary, our study indicates that RFLP assay based on digesting *CA6* amplicons with a single endonuclease *Hae*III may represent an easy specific marker to employ for *CA6* +292A/G genotypization of those individuals with differences in taste perception. Moreover, this easy experimental strategy may help to strengthen the genetic basis of food preference, which is of great importance to nutrigenomics and public health.

## Acknowledgment

This study was partially supported by 60% funds from Cagliari University.

## Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

## References

- Duffy VB, Davidson AC, Kidd JR, *et al.* (2004) Bitter receptor gene (TAS2R38), 6-n propylthiouracil (PROP) bitterness and alcohol intake. *Alcohol Clin Exp Res* 28:1629–1637.
- Fox AF (1932) The relationship between chemical constitution and taste. *Proc Natl Acad Sci U S A* 18:115–120.
- Guinard J-X, Zoumas-Morse C, Dietz J, *et al.* (1996) Does consumption of beer, alcohol, and bitter substances affect bitterness perception? *Physiol Behav* 59:625–631.
- Guo SW, Reed DR (2001) The genetics of phenylthiocarbamide perception. *Ann Hum Biol* 28:111–142.
- Harris H, Kalmus H (1949) Chemical sensitivity in genetical differences of taste sensitivity. *Ann Eugen* 15:32–45.
- Henkin RI, Law JS, Nelson NR (1988) The role of zinc on the trophic growth factors nerve growth factor and gustin. In: Hurley LS, Keen CL, Lonnerdal B, Rucker RB (eds). *Trace Elements in Man and Animal*, Vol. 6. Plenum Press, New York, pp 385–388.
- Herring AJ, Inglis NF, Ojen CK, *et al.* (1982) Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol* 16: 473–477.
- Intranuovo L, Powers A (1998) The perceived bitterness of beer and 6-n-propylthiouracil (PROP) taste sensitivity. *Ann N Y Acad Sci* 855:813–815.
- Kim UK, Jorgenson E, Coon H, *et al.* (2003) Positional cloning of the human quantitative trait locus underlying taste sensitivity to phenylthiocarbamide. *Science* 299:1221–1225.
- Padiglia A, Zonza A, Atzori E, *et al.* (2010) Sensitivity to 6-n-propylthiouracil is associated with gustin(carbonic anhydrase VI) gene polymorphism, salivary zinc, and body mass index in humans. *Am J Clin Nutr* 92:539–545.
- Rankin KM, Godinot N, Christensen CM, *et al.* (2004) Assessment of different methods for 6-n-propylthiouracil status classification. In: Prescott J, Tepper BJ (eds). *Genetic Variation in Taste Sensitivity*. Marcel Dekker, New York, pp 63–88.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour, New York.
- Tepper BJ (2008) Nutritional implications of genetic taste variation: the role of PROP sensitivity and other taste phenotypes. *Annu Rev Nutr* 28:367–388.
- Tepper BJ, Neilland M, Ullrich N, *et al.* (2010) Greater energy intake from a buffet meal in lean, young women is associated with the 6-n-propylthiouracil (PROP) non-taster phenotype. *Appetite* 56:104–110.

Address correspondence to:

Alessandra Padiglia, Ph.D.

Department of Life and Environment Sciences

Section of Biochemistry and Molecular Biology

University of Cagliari

Cittadella Universitaria di Monserrato

Monserrato 09042

Italy

E-mail: padiglia@unica.it